

На правах рукописи

КОЛЕСНИКОВА ТАТЬЯНА АЛЕКСАНДРОВНА

**НАНОКОМПОЗИТНЫЕ МИКРОКАПСУЛЫ, ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ К
УЛЬТРАЗВУКУ, И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ
ОБЪЕКТАМИ**

03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Саратов – 2010

Работа выполнена на кафедре физики полупроводников факультета нано- и биомедицинских технологий Саратовского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского

Научный руководитель: кандидат химических наук, доцент
Горин Дмитрий Александрович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов
Богатырев Владимир Александрович

доктор физико-математических наук, профессор кафедры прикладной оптики и спектроскопии физического факультета Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского
Петров Владимир Владимирович

Ведущая организация: Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится 16 ноября 2010 г. в 17 час. 30 мин. на заседании Диссертационного Совета Д 212.243.05 по специальности 03.01.02 – «Биофизика» при Саратовском государственном университете им. Н.Г. Чернышевского по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского (Саратов, ул. Университетская, 42).

Автореферат разослан 13 октября 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук, профессор

В.Л. Дербов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Разработка новых методов диагностики, лечения и мониторинга различных заболеваний является одним из ведущих направлений в области исследований современной медицины. Основной проблемой, связанной с использованием наноматериалов в этой области, является создание систем адресной доставки лекарственных препаратов, способных осуществлять их контролируемое высвобождение в непосредственной близости от пораженных участков организма. Это позволит существенно повысить эффективность действия лекарственных препаратов и значительно уменьшить их общую концентрацию в организме, и, как результат, снизить побочные эффекты от их применения.

Адресная доставка может осуществляться при помощи различных типов нано- и микроконтейнеров, пригодных для капсуляции биологически-активных веществ: наночастиц; липосом; полимерных мицелл; различных векторных конструкций, позволяющих направленно связываться и эндоцитироваться в клетки-мишени; антител, обеспечивающих селективную сорбцию контейнеров на поверхности раковых клеток; рН-чувствительных носителей. Однако использование данных объектов затруднено высокой стоимостью их изготовления и малой стабильностью во времени. В связи с этим среди потенциальных средств адресной доставки следует особо выделить полиэлектролитные микрокапсулы, полученные методом последовательной адсорбции [1].

Потенциальное использование полиэлектролитных микрокапсул в биомедицинских целях требует решения следующих задач: 1) возможность включения биологически-активных веществ в объем контейнеров с целью защиты организма от их несанкционированного действия, предохранения препаратов от внешней активной среды организма, а также обеспечения возможности их пролонгированного действия; 2) модификация свойств микроконтейнеров с целью реализации их адресной доставки к поврежденным органам и тканям, а также их локализации в строго заданных границах и областях; 3) обеспечение контролируемого высвобождения инкапсулированного вещества в непосредственной близости от пораженных участков организма.

Проницаемость оболочек микрокапсул может изменяться под действием различных факторов (температура, кислотность среды, полярность растворителя, ионная сила раствора и т.д.) [2]. Известны примеры создания биосовместимых микрокапсул с иммобилизованными в них биоактивными соединениями (белками, в частности, ферментами, ДНК, экстрактами лекарственных растений), применяемыми в биомедицине для репарации тканей [3]. Выбор в качестве составных компонентов оболочек микрокапсул материалов различной природы, позволяет получать многофункциональные носители, чувствительные к тому или иному внешнему воздействию (магнитному полю, лазерному излучению, ультразвуку и т.п.), что также существенно расширяет перспективы и повышает эффективность их использования [4-8]. Следует отметить, что не только выбор веществ, но и варьирование размера, структурирование оболочки микрокапсул путем изменения числа слоев в ней, объемной фракции различных

включений и т.п. позволяют достаточно точно управлять их физическими и химическими свойствами и делают возможной реализацию принципа «снизу-вверх».

Однако для достижения желаемого эффекта необходимо иметь механизм высвобождения закапсулированного вещества из объема микроконтейнеров. Воздействовать на проницаемость оболочек микрокапсул можно различными способами. Так, существуют работы по вскрытию микрокапсул лазерным излучением внутри клеток (*in vitro*) [8]. Однако в этом случае для достижения требуемых плотностей мощности лазерного излучения нужна его фокусировка на поверхности оболочки капсулы, что не всегда достижимо, особенно в биологических средах. В области биомедицинского применения, например, в терапии раковых заболеваний, зачастую требуется менее локальное воздействие, приводящее к одновременному вскрытию множества микрокапсул. Примером такого дистанционного, группового воздействия является ультразвук [6, 7]. Следует отметить, что ультразвук широко применяется в медицине в качестве средства диагностики и лечения многих (в том числе онкологических) заболеваний (ультразвуковая гипертермия, неинвазивная HIFU хирургия, сонодинамическая терапия). Известна возможность использования твердофазных нановключений-соносенсибилизаторов в биологических структурах в качестве концентраторов ультразвуковой энергии [7].

Возможность использования неорганических наночастиц в качестве соносенсибилизаторов, повышающих чувствительность полиэлектролитных микрокапсул к ультразвуку, показана ранее на примере наночастиц магнетита [6]. Однако на данный момент мощности ультразвука, используемого для разрушения оболочек микрокапсул, намного превышают безопасные терапевтические мощности. Добиться разрушения микрокапсул при меньших мощностях и более высоких частотах ультразвука можно путем подбора соносенсибилизаторов, а также варьирования их объемной фракции в оболочке. Это позволит управлять механическими свойствами капсул и, следовательно, их чувствительностью к ультразвуку. В данной работе в качестве соносенсибилизаторов были выбраны наночастицы магнетита и оксида цинка. Магнетит может использоваться для функционализации оболочек микрокапсул с целью обеспечения их управляемого перемещения под действием магнитного поля. Выбор наночастиц оксида цинка обусловлен тем, что они являются хорошим антибактериальным агентом [9] и применяются в терапии онкологических заболеваний [10].

Цель работы и задачи исследования

Целью диссертационной работы явилось создание нанокompозитных микрокапсул, чувствительных к ультразвуку, повышение их чувствительности путем оптимизации состава и структуры оболочек, а также изучение взаимодействия капсул с биологическими средами и объектами.

Основными задачами исследования являлись:

1. Получение нанокompозитных микрокапсул, содержащих в структуре оболочки наночастицы магнетита, и исследование их чувствительности к

ультразвуку в зависимости от объемной фракции наночастиц магнетита в оболочке.

2. Формирование и оптимизация структуры и состава оболочек микрокапсул, модифицированных наночастицами оксида цинка, с целью повышения чувствительности капсул к ультразвуку путем варьирования объемной фракции наночастиц оксида цинка. Изучение взаимосвязи между параметрами, характеризующими механические свойства оболочек микрокапсул и их чувствительности к ультразвуковой обработке в зависимости от объемной фракции наночастиц оксида цинка.
3. Исследование взаимодействия микрокапсул, модифицированных наночастицами оксида цинка, с клетками крови и определение влияния физиологических свойств среды диспергирования (фосфатного буфера, плазмы крови и цельной крови) на чувствительность микрокапсул к ультразвуковой обработке.
4. Изучение процесса фагоцитоза микрокапсул белыми клетками крови в зависимости от их размера и строения оболочки. Изучение возможности использования фагоцитоза в качестве средства утилизации фрагментов оболочек нанокompозитных микрокапсул, образованных в результате ультразвуковой обработки.
5. Определение токсического эффекта, оказываемого ZnO-композитными микрокапсулами со структурой оболочки $(\text{PAH/PSS})_2(\text{ZnO/PSS})_3$ (PAH/PSS) и их составляющими компонентами на гидробионтов (циериодафний (*Ceriodaphnia affinis*), люминесцентных генноинженерных бактерий *Escherichia coli*, 1885, M-17, личинок хирономид (*Chironomus riparius*) и аквариумных рыб *D. rerio*).

Научная новизна работы

1. Продемонстрирована возможность разрушения нанокompозитных микрокапсул под действием низкочастотного (27 кГц) ультразвука с плотностью мощности 3.5 Вт/см^2 в течение нескольких минут и обнаружена зависимость чувствительности капсул от объемной фракции наночастиц магнетита в структуре оболочки [Л4, Л6].
2. Получены нанокompозитные микрокапсулы, функционализированные наночастицами оксида цинка, обнаружена высокая чувствительность данного типа контейнеров к низкочастотному (20 кГц) ультразвуку с плотностью мощности 0.6 Вт/см^2 , установлена зависимость механических свойств микрокапсул и их чувствительности к ультразвуку от объемной фракции наночастиц оксида цинка в оболочке [Л8].
3. Произведено разрушение ZnO-композитных оболочек микрокапсул под действием низкочастотного (20 кГц) ультразвука с плотностью мощности 0.6 Вт/см^2 в физиологических средах – фосфатно-солевом буфере, плазме крови и крови. Показана возможность разрушения ZnO-композитных капсул в крови под действием ультразвука, не приводящая к нарушению цело-

стности клеток крови [Л10].

4. Изучен механизм взаимодействия клеток крови с микрокапсулами в зависимости от их размера (фагоцитоз капсул) и показана возможность утилизации фрагментов оболочек, образовавшихся после ультразвукового разрушения капсул, посредством фагоцитоза.
5. Установлено снижение токсического эффекта, оказываемого нанокompозитными микрокапсулами $(\text{PAH/PSS})_2(\text{ZnO/PSS})_3(\text{PAH/PSS})$ на гидробионтов, по сравнению с их составляющими компонентами – полиэлектролитами и наночастицами оксида цинка.

Научно-практическая значимость работы

Созданы нанокompозитные микрокапсулы с наночастицами магнетита в структуре оболочки, обладающие чувствительностью к магнитному полю и ультразвуковому излучению, что обеспечивает возможность реализации управляемой магнитным полем адресной доставки лекарственных веществ с последующим вскрытием микрокапсул при помощи ультразвука.

Реализовано существенное повышение чувствительности микрокапсул к ультразвуку путем встраивания в структуру их оболочек в качестве соносенсибилизатора наночастиц оксида цинка, что значительно повышает перспективы их использования в биомедицинских целях в качестве контейнеров адресной доставки за счет снижения необходимой для разрушения капсул мощности ультразвука и сокращения времени ультразвуковой обработки.

Продемонстрировано взаимодействие нанокompозитных микрокапсул, содержащих наночастицы оксида цинка, с клетками крови, показана гемосовместимость данного типа микроконтейнеров и обнаружена зависимость протекания процесса фагоцитоза от размера капсул, что позволяет использовать явление фагоцитоза в качестве средства утилизации фрагментов оболочек микрокапсул, образовавшихся после их вскрытия ультразвуком.

Обнаружен эффект разрушения ZnO-композитных микрокапсул в суспензии эритроцитов в результате ультразвуковой обработки, сопровождающийся частичным разрушением эритроцитов, то есть обнаружены пороговые параметры ультразвука, применимого для вскрытия капсул в присутствии биологических объектов, и показана необходимость дальнейшего повышения чувствительности микрокапсул путем подбора соносенсибилизаторов или путем оптимизации частоты и мощности ультразвука.

Произведен анализ токсичности ZnO-композитных микрокапсул и их составляющих компонент с использованием в качестве тест-систем гидробионтов (цериодафний (*Ceriodaphnia affinis*), люминесцентных генноинженерных бактерий *Escherichia coli*, 1885, M-17, личинок хирономид (*Chironomus riparius*) и аквариумных рыб *D. rerio*). Установлено, что наибольшей токсичностью из всех используемых компонент микрокапсул обладает раствор катионного полиэлектролита полиалиламина гидрохлорида (PAH) по сравнению с полистиролсульфонатом натрия (PSS), комплексом PAH+PSS, наночастицами оксида цинка и микрокапсулами. Обнаружено существенное снижение острого токсиче-

ского эффекта для случая полиэлектролитного комплекса PАН+PSS, а также суспензии микрокапсул (PАН/PSS)₂(ZnO/PSS)₃(PАН/PSS).

Достоверность полученных результатов

Достоверность полученных результатов обусловлена применением в экспериментах стандартной измерительной аппаратуры и подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Изменение числа циклов адсорбции наночастиц магнетита (ζ -потенциал - 12.5 ± 4 мВ, рН 7) позволяет регулировать чувствительность микрокапсул к низкочастотному ультразвуку (27 кГц, 3.5 Вт/см²). При проведении одного цикла адсорбции магнетита наблюдается увеличение чувствительности микрокапсул к ультразвуку по сравнению с капсулами без наночастиц. Дальнейшее увеличение числа циклов адсорбции магнетита приводит к снижению ультразвуковой чувствительности капсул, что связано с характером адсорбции и распределением наночастиц магнетита в оболочке.
2. Введение наночастиц оксида цинка (ζ -потенциал $+36 \pm 5$ мВ, рН 7) существенно увеличивает чувствительность полиэлектролитных капсул к низкочастотному ультразвуку (20 кГц, 0.6 Вт/см²). Увеличение числа циклов адсорбции наночастиц (от 1 до 4) приводит к повышению чувствительности капсул, что связано с уменьшением модуля Юнга (от 580 МПа до 31 МПа) и объясняется недостатком полимера, выступающего в нанокompозитной оболочке в качестве связующего компонента.
3. Инкубация в крови нанокompозитных микрокапсул, модифицированных наночастицами оксида цинка, не приводит к гемолизу. Для капсул с диаметром ~ 10 мкм процесс фагоцитоза затруднен. Фрагменты капсул после ультразвуковой обработки, капсулы диаметром 1 мкм и их агрегаты успешно фагоцитируются белыми клетками крови.
4. Из составляющих компонент нанокompозитных микрокапсул со структурой оболочки (PАН/PSS)₂(ZnO/PSS)₃(PАН/PSS) максимальный токсический эффект на гидробионтов оказывает катионный полиэлектролит полиалиламин гидрохлорид (PАН). Минимальное токсическое действие на гидробионтов оказывают нанокompозитные микрокапсулы, что связано с наличием упорядоченного полиэлектролитного комплекса и компенсацией избыточных зарядов молекул полиэлектролитов в структуре оболочки микрокапсулы.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на Всероссийской научной конференции «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине (СГУ, 2007); Международной конференции «Saratov Fall Meeting 2007» в секции Nanobiophotonics (Саратов, 2007, устный доклад); научном семинаре, проводимом в рамках российско-британского проекта BRIDGE (Саратов, 2007,

устный доклад); 2-ой школе-семинаре «Наночастицы, наноструктурированные покрытия и микроконтейнеры: технология, свойства, применение» в рамках Фестиваля науки, посвященного празднованию 100-летнего юбилея СГУ (Саратов, 2009, устный доклад); 1-ой Международной научной школе «Нано 2009. Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах» (Москва, 2009, победитель постерной сессии); Международной конференции «Saratov Fall Meeting 2009» в секции Nanobiophotonics (Саратов, 2009, устный доклад), совместном семинаре Германской службы академических обменов (DAAD) для стипендиатов российско-германских программ «Михаил Ломоносов» и «Иммануил Кант» (Москва, 2010), а также на семинарах рабочей группы и кафедры.

Гранты

Работа, представленная в диссертации, выполнена при финансовой поддержке следующих проектов: «Создание нанокompозитных планарных слоев и оболочек микрокапсул методом полиионной самосборки и исследование их физических свойств» (Мин. образования и науки РФ РИ-19.0/002/227 ГК №02.442.11.7183) (2005 г.); «Формирование нанокompозитных микро- и наноразмерных структур и исследование их физических свойств» (Мин. образования и науки РФ бРИ-19.0/001/051 ГК №02.442.11.7249) (2006 г.); «Функционализированные наночастицы с настраиваемым плазмонным резонансом и полиэлектролитные микрокапсулы с наночастицами в составе оболочки» (Мин. образования и науки РФ 2007-3-1.3-07-01-081 ГК №02.513.11.3043) (2007 г.); Инновационно-образовательная программа СГУ (2007-2008 гг.); «Исследование возможности создания водных суспензий микрокапсул с нанокompозитными оболочками, чувствительными к микроволновому и ультразвуковому облучению» (совместный российско-немецкий проект РФФИ № 06-02-04009 и DFG 436 RUS 113/844/0-1) (2008-2009 гг.); совместная программа Министерства образования и науки РФ и Германской службы академических обменов (DAAD) «Михаил Ломоносов II» (проект А/08/96088) (2009-2010 гг.).

Личный вклад диссертанта

Личный вклад автора состоит в самостоятельном выполнении представленных в диссертации экспериментальных исследований и расчетов, связанных с получением микрокапсул, изучением их физических и механических свойств различными методами, а также анализом полученных результатов. Постановка задач исследования и обсуждение результатов проведены под руководством доцента Д.А. Горина. При использовании результатов других авторов или полученных в соавторстве результатов даются соответствующие ссылки на источник.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 4 статьи в научных журналах списка ВАК, 1 статья в сборнике конференций, 3 тезисов докладов, 1 учебно-методическое пособие и 1 глава в монографии, изданной за рубежом. Имеется 1 положительное решение о выдаче патента на изобретение.

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из введения, 4 глав, заключения, списка литературы, включающего 221 источник. Общий объем диссертации составляет 166 страниц, включая 75 рисунков и 11 таблиц.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы, рассмотрена новизна, практическая значимость, сформулированы цель работы, основные задачи исследований, приведены основные положения, выносимые автором на защиту.

Первая глава содержит аналитический обзор по теме диссертации. В ней сформулированы основные принципы создания и изучения физико-химических свойств оболочек полиэлектролитных и нанокompозитных микрокапсул, описаны различные методики капсуляции органических реагентов и рассмотрены способы реализации адресной доставки. Описаны методики изучения механических свойств микрокапсул, а также их зависимость от различных факторов (выбора материала и размера ядра, растворителя, комбинации полиэлектролитов и их концентрации, числа слоев и толщины оболочки микрокапсулы, наличия соли и ее концентрации, рН среды, присутствия неорганических нановключений в оболочке и их объемной фракции и т.д.). Проведен анализ принципов, лежащих в основе построения математических моделей для расчета механических свойств оболочек микрокапсул. Описаны эффекты, возникающие в различных средах при распространении ультразвуковых волн в зависимости от их частоты и интенсивности, а также механизм акустической кавитации и применение УЗ в терапии онкологических заболеваний. Приведен анализ результатов работ по изучению взаимодействия микрокапсул с живыми клетками, исследованию их цитотоксичности, изучению поглощения капсул клетками методом проточной цитометрии.

Вторая глава посвящена описанию результатов создания и характеристики нанокompозитных микрокапсул, модифицированных наночастицами магнетита, углеродными нанотрубками и наночастицами магнетита, а также наночастицами оксида цинка. Формирование оболочек полиэлектролитных микрокапсул во всех случаях проводили с использованием синтетических полиэлектролитов полиалиламина гидрохлорида (ПАН) и полистиролсульфоната натрия (PSS) (молекулярная масса 70 кДа, концентрация 2 мг/мл, Sigma-Aldrich, Германия) в виде солевых растворов (0.5 М NaCl).

Микрокапсулы с наночастицами магнетита

Микрокапсулы с наночастицами магнетита получены с использованием в качестве ядер частиц полистирольного латекса диаметром 5.3 ± 0.1 мкм и 9.6 ± 0.1 мкм. Характерные размеры наночастиц магнетита, оцененные по изображениям просвечивающей электронной микроскопии, составили 8-20 нм. ζ -потенциал наночастиц магнетита был отрицательным (-12.5 ± 4.0 мВ, рН 7), что определило их положение в структуре получаемых покрытий между слоями катионного полиэлектролита.

На основе исследования полученных микрокапсул методами оптической,

просвечивающей электронной и атомно-силовой микроскопии установлено, что минимальное и максимальное число слоев в структуре оболочек, необходимое для формирования стабильных недеформированных микрокапсул, равно 10 и 16 для 10-мкм капсул и 10 и 14 для 5-мкм капсул, соответственно. Полученные данные хорошо согласуются с результатами работы [11]. Таким образом, выявлена зависимость стабильности капсул от числа слоев, которая является функцией толщины их оболочки.

Экспериментальные образцы микрокапсул, синтезированных на ядрах полистирольного латекса диаметром 9.6 ± 0.1 мкм, были разделены на три группы. Первая группа состояла из образцов, не содержащих в структуре оболочек магнитных наночастиц. Структура образцов: $(\text{PAH/PSS})_n$, где $n = 5; 6; 7; 8$ – число полиэлектролитных бислоев. Вторая группа различалась общим числом слоев в оболочке капсул (10, 12, 14 и 16) при одинаковом значении числа слоев магнитных наночастиц (2 слоя). Третья – числом слоев наночастиц магнетита (от 1 до 5) при одинаковом значении общего числа слоев в оболочке (16 слоев).

Методом ПЭМ были исследованы микрокапсулы с наночастицами магнетита, и показано, что для наночастиц характерно островковое расположение в структуре оболочки.

Морфологию поверхности микрокапсул в зависимости от их строения исследовали средствами атомно-силовой микроскопии (АСМ). По профилям высоты была рассчитана толщина оболочек микрокапсул (Таблица 1).

Таблица 1. Изменение толщины микрокапсул в зависимости от структуры их оболочек [Л4].

Общее число слоев	Число слоев Fe_3O_4	Структура оболочки	Толщина оболочки, нм
10	2	$(\text{PAH/PSS})_2(\text{PAH/Fe}_3\text{O}_4)_2(\text{PAH/PSS})$	23 ± 1
12	2	$(\text{PAH/PSS})_2(\text{PAH/Fe}_3\text{O}_4)_2(\text{PAH/PSS})_2$	26 ± 2
14	0	$(\text{PAH/PSS})_7$	47 ± 4
14	2	$(\text{PAH/PSS})_2(\text{PAH/Fe}_3\text{O}_4)_2(\text{PAH/PSS})_3$	39 ± 3
16	0	$(\text{PAH/PSS})_8$	59 ± 8
16	1	$(\text{PAH/PSS})_2(\text{PAH/Fe}_3\text{O}_4)(\text{PAH/PSS})_5$	51 ± 3
16	2	$(\text{PAH/PSS})_2(\text{PAH/Fe}_3\text{O}_4)_2(\text{PAH/PSS})_4$	60 ± 5
16	3	$(\text{PAH/PSS})_2(\text{PAH/Fe}_3\text{O}_4)_3(\text{PAH/PSS})_3$	66 ± 2
16	4	$(\text{PAH/PSS})_2(\text{PAH/Fe}_3\text{O}_4)_4(\text{PAH/PSS})_2$	52 ± 4
16	5	$(\text{PAH/PSS})_2(\text{PAH/Fe}_3\text{O}_4)_5(\text{PAH/PSS})$	55 ± 2

Результаты показали, что встраивание наночастиц магнетита в структуру оболочки приводило к уменьшению ее толщины по сравнению с капсулами, не содержащими наночастиц. Так, значение толщины для 14-слойных капсул $(\text{PAH/PSS})_7$ без наночастиц магнетита составило 47 ± 4 нм, тогда как толщина капсул $(\text{PAH/PSS})_2(\text{PAH/Fe}_3\text{O}_4)_2(\text{PAH/PSS})_3$ с тем же общим числом слоев, но с двумя слоями магнитных наночастиц составила 39 ± 3 нм. В данном случае различие в толщине, скорее всего, связано с более слабым электростатическим

взаимодействием между поликатионом и наночастицами, нежели между молекулами противоположно заряженных полиэлектролитов [Л4]. В результате анализа зависимости толщины оболочек микрокапсул от общего числа полиэлектролитных слоев в их структуре (при одинаковом числе слоев магнитных наночастиц) установлен нелинейный рост толщины, наблюдаемый при увеличении общего числа ПЭ-слоев в оболочке, причем характер нелинейности выражен сильнее для меньшего числа слоев (Рис. 1). Данная зависимость хорошо согласуется с литературными данными, полученными для планарных слоев на твердых подложках [12].

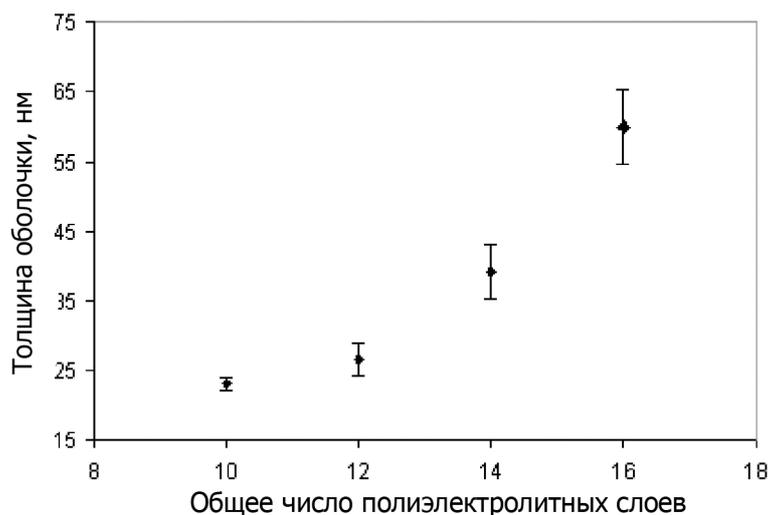


Рис. 1. Зависимость толщины оболочки микрокапсул от общего числа полиэлектролитных слоев [Л4].

На примере 16-слойных микрокапсул обнаружена зависимость толщины оболочки от числа стадий адсорбции наночастиц магнетита (таблица 1). Так, при увеличении числа стадий адсорбции наночастиц от 1 до 3 происходил рост толщины оболочки, а для 4 и 5 слоев магнетита наблюдалось ее уменьшение. Характер данной немонотонной зависимости связан с тем, что увеличение числа слоев магнитных наночастиц приводило, с одной стороны, к увеличению толщины оболочек капсул, а с другой стороны – к уменьшению числа блокирующих полиэлектролитных слоев и, как следствие, к увеличению вероятности десорбции наночастиц из оболочки в процессе растворения ядер. Это в свою очередь вызывало уменьшение толщины ПЭ-оболочки. Поскольку данные процессы являлись конкурирующими, максимум по толщине достигался при наличии в структуре оболочки трех слоев наночастиц магнетита.

С целью изучения влияния ультразвука на свойства сформированных полиэлектролитных и нанокомпозитных оболочек микрокапсул водную суспензию капсул обрабатывали ультразвуком различной длительности с частотой ~ 27 кГц и плотностью мощности ~ 3.5 Вт/см² с использованием установки УРСК N070 (Россия). При данных параметрах основное влияние ультразвук оказывает за счет возникновения явления кавитации. Для жидкостей и биологических тканей кавитационный порог составляет 0.3 Вт/см².

Реакцию капсул на облучение ультразвуком контролировали средствами

оптической и атомно-силовой микроскопии. Обнаружили возможность дистанционного разрушения капсул, модифицированных наночастицами магнетита, под действием ультразвука (Рис. 2). При этом методом атомно-силовой микроскопии фрагментов оболочек микрокапсул установлено, что ультразвуковая обработка приводит к нарушению целостности оболочек, а их толщина и состав остаются неизменными.

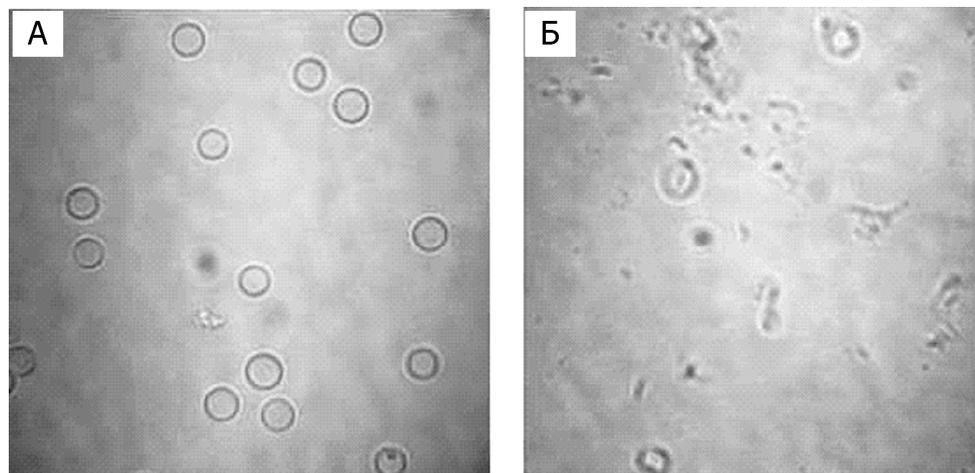


Рис. 2. Результаты оптической микроскопии нанокomпозитных микрокапсул со структурой оболочки $(\text{PAN/PSS})_2(\text{PAN/Fe}_3\text{O}_4)_2(\text{PAN/PSS})_2$ до (А) и после (Б) ультразвуковой обработки [Л4].

Обнаружено, что введение магнитных наночастиц в состав оболочек микрокапсул на этапе синтеза увеличивает их чувствительность к ультразвуку, тогда как рост их объемной фракции приводит к снижению данной чувствительности. Повышение УЗ-чувствительности, наблюдаемое при встраивании наночастиц магнетита в структуру оболочки капсул, может быть связано с уменьшением их толщины по сравнению с толщиной полиэлектролитных капсул. Следовательно, для их разрушения ультразвуком требуется меньшее время воздействия. При увеличении числа стадий адсорбции наночастиц от 2 до 5 требовалось увеличивать время УЗ-воздействия от 2.5 до 4.5 минут для полного разрушения микрокапсул. Снижение УЗ-чувствительности скорее всего связано с более равномерным распределением наночастиц магнетита в структуре оболочки при увеличении числа стадий их адсорбции, которое вызвано взаимопроникновением слоев наночастиц и полимера. В результате однородность оболочки повышается, что приводит к увеличению ее эластичности и уплотнению структуры, т.е. повышению механической прочности микрокапсул и их устойчивости к действию ультразвука.

Показано, что увеличение общего числа полиэлектролитных слоев в структуре оболочек микрокапсул требует более продолжительного времени ультразвукового воздействия для их разрушения. Это объясняется увеличением толщины оболочек микрокапсул с ростом числа ПЭ-слоев. Кроме того, обнаружено, что чувствительность капсул к ультразвуку зависит от их размера – для капсул большего диаметра чувствительность к ультразвуку выше, чем для

капсул меньшего диаметра. Это объясняется изменением устойчивости микрокапсул к ультразвуку, которая определяется соотношением между толщиной оболочки капсулы и ее диаметром. Чем больше данное соотношение, тем устойчивее капсула к внешнему воздействию.

Микрокапсулы с наночастицами магнетита и углеродными нанотрубками

Второй раздел посвящен созданию многофункциональных микрокапсул $(\text{PAH/PSS})_3(\text{PAH/Fe}_3\text{O}_4)(\text{PAH/PSS})_3(\text{PAH/CNTs/PAH})$, модифицированных наночастицами магнетита и углеродными нанотрубками. ПЭМ-изображения микрокапсул показывают неравномерное, островковое расположение наночастиц магнетита в структуре оболочки и их склонность к агрегации (Рис. 3). При этом поверхность капсул покрыта сеткой из углеродных нанотрубок. Данная структура приводит к увеличению механической прочности капсул в целом.

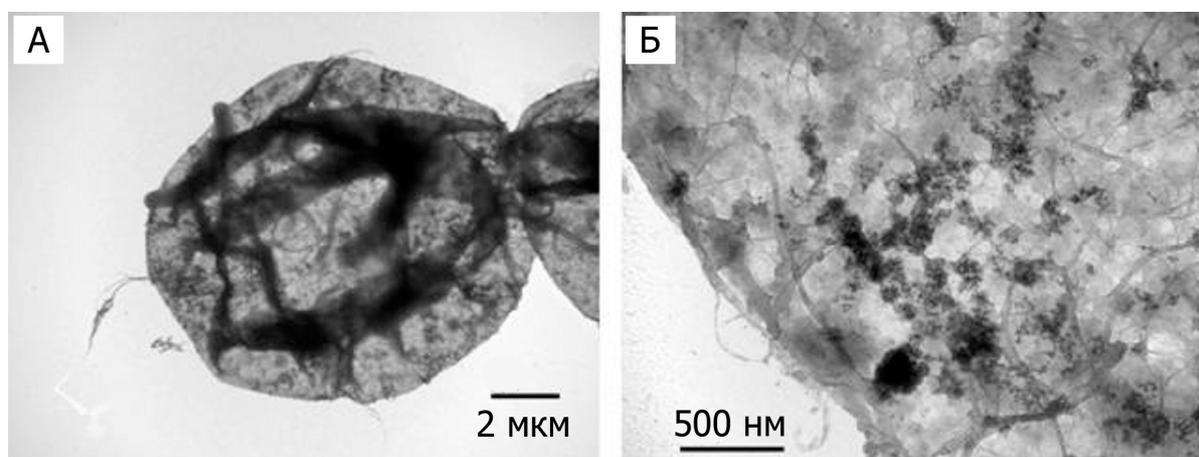


Рис. 3. ПЭМ-изображения общего вида микрокапсул (А) и их оболочки (Б) для образца состава $(\text{PAH/PSS})_3(\text{PAH/Fe}_3\text{O}_4)(\text{PAH/PSS})_3(\text{PAH/CNTs/PAH})$.

Морфологию поверхности микрокапсул исследовали средствами атомно-силовой микроскопии. Значение толщины оболочки составило 50 ± 3 нм. Следует отметить, что полученное значение хорошо согласуется с толщиной 16-слойных капсул с одним слоем наночастиц магнетита в структуре оболочки (Таблица 1). Так, для капсул со структурой оболочки $(\text{PAH/PSS})_2(\text{PAH/Fe}_3\text{O}_4)(\text{PAH/PSS})_5$ значение толщины составило 51 ± 3 нм.

Ультразвуковую обработку мультифункциональных оболочек микрокапсул производили с использованием установки УРСК N070 (Россия), работающей на частоте 27 кГц и плотности мощности 3.5 Вт/см^2 . Установили, что для разрушения данного типа микроконтейнеров требуется более длительное воздействие ультразвука (порядка 10 минут), чем в случае микрокапсул, функционализированных наночастицами магнетита. Снижение чувствительности оболочек микрокапсул к УЗ подтвердило предположение об увеличении механической прочности капсул за счет наличия на их поверхности плотной сетки из углеродных нанотрубок.

Микрокапсулы с наночастицами оксида цинка

Данный раздел посвящен формированию и исследованию нанокомпозитных микрокапсул, модифицированных наночастицами оксида цинка (ZnO). Значение ζ -потенциала для наночастиц оксида цинка составило $+36.2 \pm 5$ мВ (при pH 7), что определило положение наночастиц ZnO между слоями анионного полиэлектролита.

Выбор наночастиц оксида цинка в качестве соносенсибилизатора был обусловлен тем, что наночастицы ZnO являются хорошим антибактериальным агентом [9] и применяются в терапии онкологических заболеваний [10].

Образцы микрокапсул, сформированные на поверхности частиц полистирольного латекса диаметром 10.25 ± 0.09 мкм, различались наличием или отсутствием в структуре оболочки наночастиц оксида цинка, а также числом слоев наночастиц (от 1 до 4). Адсорбцию противоположно заряженных молекул полиэлектролитов и наночастиц ZnO контролировали путем измерения ζ -потенциала коллоидных частиц. Наночастицы оксида цинка и ZnO-композитные микрокапсулы исследовали методом просвечивающей электронной микроскопии (Рис. 4). Результаты ПЭМ выявили увеличение объемной фракции наночастиц оксида цинка в оболочке капсул при увеличении числа стадий их адсорбции от 1 до 3, однако обнаружили отсутствие существенных различий для капсул с 3 и 4 слоями ZnO, что свидетельствовало о насыщении оболочки микрокапсул наночастицами уже после проведения трех стадий адсорбции ZnO.

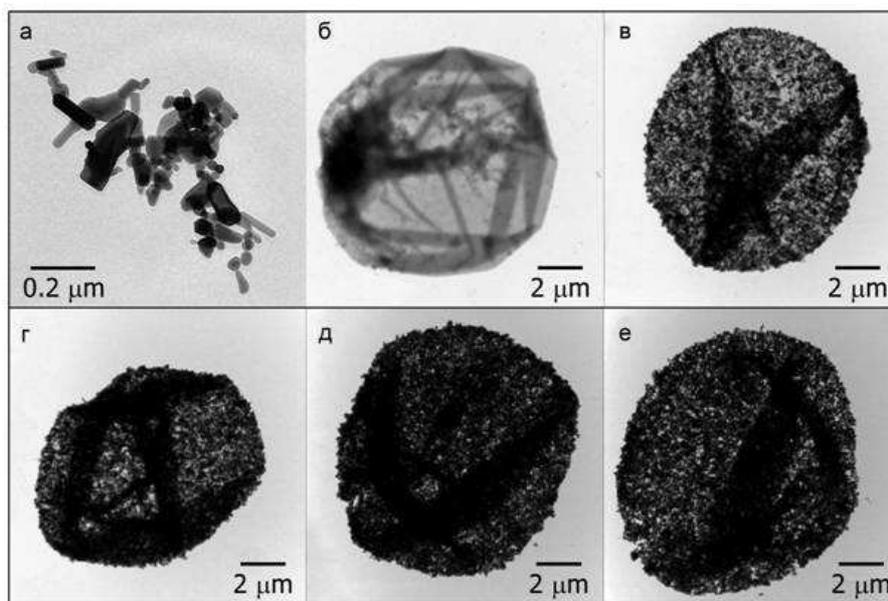


Рис. 4. Результаты исследования наночастиц (а) и микрокапсул (б-е) методом просвечивающей электронной микроскопии. Структуры оболочек микрокапсул:

- б – (PAH/PSS)₆;
- в – (PAH/PSS)₂(ZnO/PSS)(PAH/PSS)₃;
- г – (PAH/PSS)₂(ZnO/PSS)₂(PAH/PSS)₂;
- д – (PAH/PSS)₂(ZnO/PSS)₃(PAH/PSS);
- е – (PAH/PSS)(ZnO/PSS)₄(PAH/PSS) [18].

Морфологию поверхности микрокапсул, различающихся числом слоев наночастиц ZnO, также исследовали средствами сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (Рис. 5). Анализ результатов ПЭМ и СЭМ показал, что с увеличением числа слоев ZnO в структуре оболочки микрокапсулы происходило увеличение ее диаметра после высыхания, что свидетельствовало об изменении механических свойств микрокапсул. Методом атомно-силовой микроскопии была проведена количественная характеристика некоторых морфологических параметров микрокапсул, таких как диаметр, толщина оболочки (d_{sh}), эффективная толщина, приходящаяся на один полиэлектролитный слой (в случае капсул без наночастиц), эффективная толщина слоя наночастиц ZnO (в случае ZnO-композитных капсул) (d_{NP}), средняя шероховатость поверхности (R_a) и объемная фракция наночастиц в оболочке (φ_{NP}) (Таблица 2).

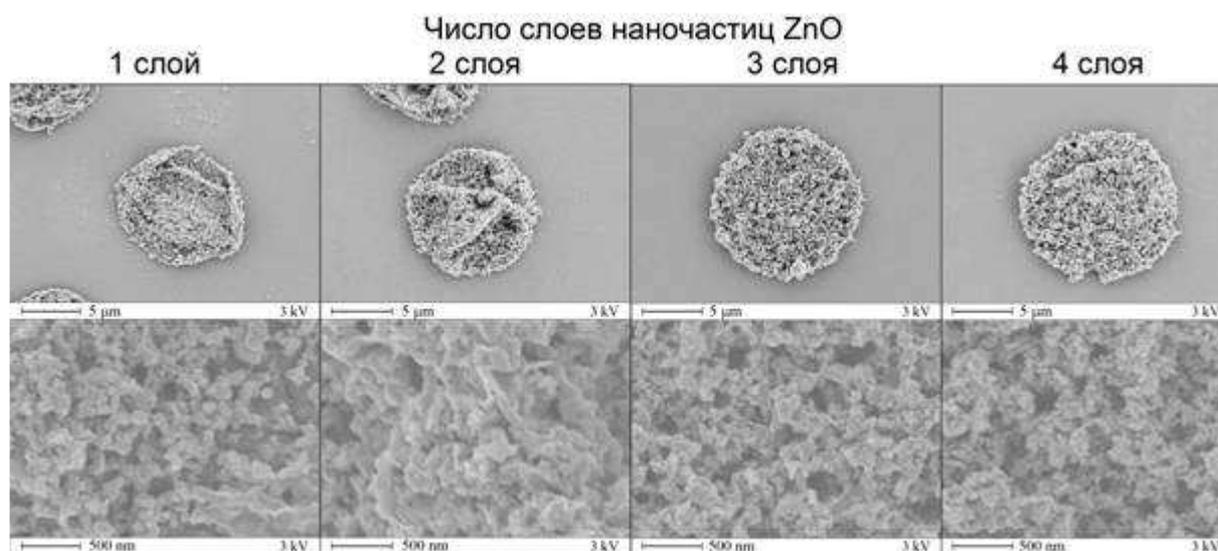


Рис. 5. Изображения микрокапсул с различным числом слоев наночастиц ZnO в оболочке, полученные методом сканирующей электронной микроскопии [18].

Таблица 2. Параметры микрокапсул с различным числом слоев наночастиц ZnO, рассчитанные по анализу результатов атомно-силовой микроскопии [18].

Число слоев ZnO	Диаметр оболочки, мкм	Толщина оболочки (d_{sh}), нм	Эффективная толщина слоя ZnO (d_{NP}), нм	Средняя шероховатость (R_a), нм	Объемная фракция ZnO (φ_{NP})
0	10.2 ± 0.2	32 ± 2	-	9 ± 1	-
1	11.1 ± 0.5	38 ± 7	8	43 ± 8	0.21
2	12.9 ± 0.3	56 ± 6	15	31 ± 4	0.52
3	13.1 ± 0.3	97 ± 7	24	25 ± 8	0.75
4	14.8 ± 0.3	104 ± 4	21	26 ± 4	0.79

Данные таблицы количественно подтверждают обнаруженное ранее методами ПЭМ и СЭМ увеличение диаметра оболочки капсул после высушивания с увеличением числа слоев ZnO. Кроме того установлено, что толщина оболочки нелинейно увеличивается с ростом числа слоев наночастиц оксида цинка (рис.

б). Данный характер приведенной зависимости для толщины хорошо согласуется со значениями шероховатости и эффективной толщины, приходящейся на слой наночастиц оксида цинка. Достаточно малое значение эффективной толщины для капсул с одним слоем ZnO ($d_{NP} = 8$ нм) говорит о преимущественной адсорбции наночастиц из наиболее мелкой фракции. В то же время, шероховатость поверхности капсул с 1 слоем ZnO (43 нм) резко увеличивается по сравнению с полиэлектролитными капсулами без наночастиц (9 нм), что, скорее всего, свидетельствует об «островковом» заполнении оболочки наночастицами на начальной стадии адсорбции. Дальнейшее уменьшение шероховатости капсул при увеличении числа слоев ZnO свидетельствует о заполнении наночастицами промежутков между «островками» и сглаживании неровностей оболочки. Также следует отметить, что шероховатость капсул с 3 и 4 слоями наночастиц практически не меняется в пределах погрешности и составляет 25 ± 8 нм и 26 ± 4 нм, соответственно. Следовательно, при адсорбции большого количества наночастиц возникает недостаток полиэлектролита для их закрепления в оболочке.

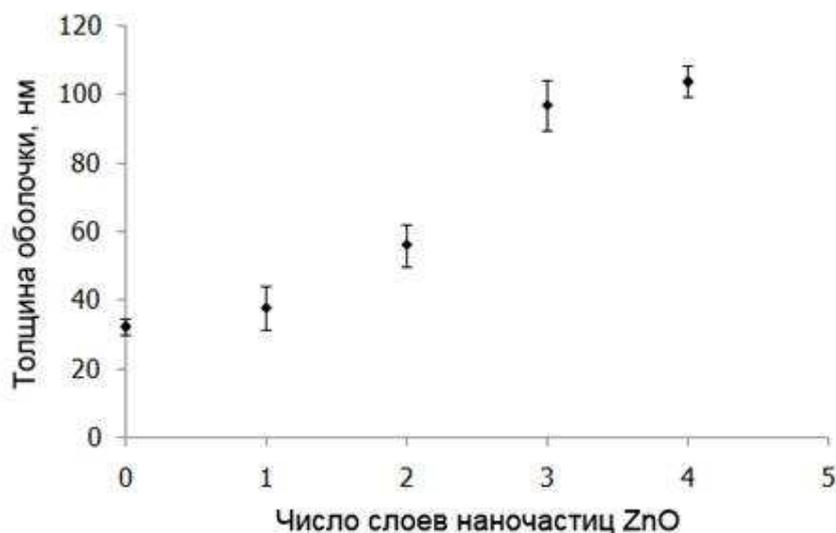


Рис. 6. Изменение толщины оболочки нанокompозитных капсул в зависимости от числа слоев наночастиц ZnO в оболочке [Л18].

Для расчета объемной фракции наночастиц ZnO в оболочке микрокапсул была получена следующая формула:

$$\varphi_{NP} \approx \frac{d_{NP} \cdot N_{NP}}{d_{sh}} = 1 - \frac{d_{PE} \cdot N_{PE}}{d_{sh}}, \quad (1)$$

где d_{NP} – эффективная толщина, приходящаяся на один слой наночастиц ZnO в оболочке, N_{NP} – число слоев наночастиц ZnO, d_{sh} – полная толщина оболочки микрокапсулы, d_{PE} и N_{PE} – эффективная толщина полиэлектролитного слоя и число полиэлектролитных слоев в структуре оболочки микрокапсулы, соответственно. Расчет показал, что объемная фракция наночастиц росла с увеличением числа слоев ZnO от 1 до 3, однако при добавлении 4 слоя не происходило каких-либо существенных изменений, что объяснялось недостатком полиэлектролитного «клея» в оболочке капсулы.

Механические свойства ZnO-композитных микрокапсул в зависимости от объемной фракции наночастиц исследовали средствами атомно-силовой спектроскопии. Экспериментальные кривые зависимости силы от деформации для капсул с различным числом слоев наночастиц оксида цинка в структуре оболочки представлены на рисунке 7. Жесткость микрокапсул определяли по начальному наклону кривых деформации (Таблица 3). На основе полученных значений для жесткости и в предположении, что для микрокапсул в первом приближении может применяться аппроксимирующая модель тонкой оболочки [13], были рассчитаны значения эффективного модуля Юнга для микрокапсул с различной объемной фракцией наночастиц ZnO в оболочке. В результате установлено, что увеличение объемной фракции наночастиц ZnO приводило к нелинейному уменьшению эффективного значения модуля Юнга и, соответственно, снижению сопротивления капсул деформации.

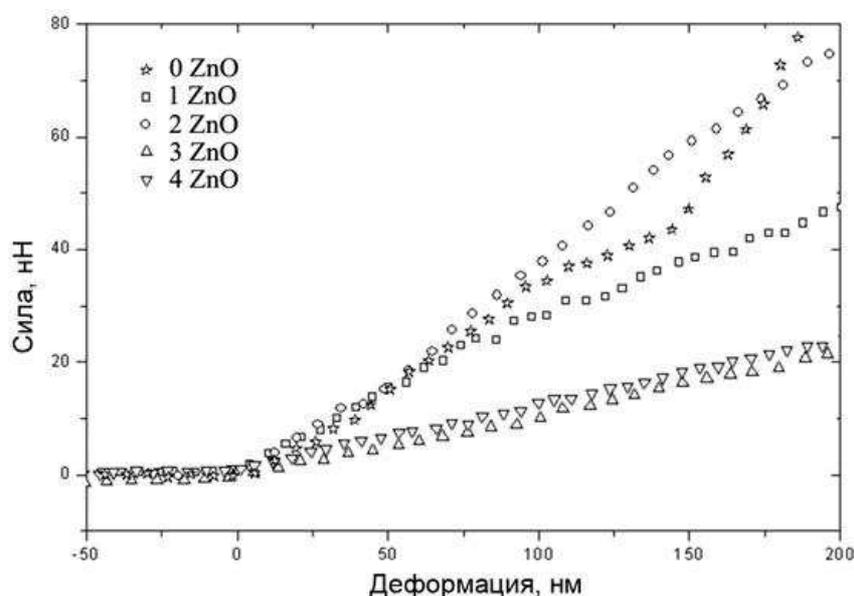


Рис. 7. Экспериментальные кривые зависимости силы от деформации для капсул с различным числом слоев наночастиц ZnO в структуре оболочки [Л8].

Таблица 3. Механические свойства микрокапсул в зависимости от структуры оболочки [Л8]

Число слоев ZnO	Структура оболочки	Жесткость, Н/м	Модуль Юнга, МПа
0	(PAH/PSS) ₆	0.303 ± 0.149	580 ± 286
1	(PAH/PSS) ₂ (ZnO/PSS)(PAH/PSS) ₃	0.259 ± 0.100	403 ± 156
2	(PAH/PSS) ₂ (ZnO/PSS) ₂ (PAH/PSS) ₂	0.339 ± 0.112	275 ± 91
3	(PAH/PSS) ₂ (ZnO/PSS) ₃ (PAH/PSS)	0.098 ± 0.032	27.1 ± 8.8
4	(PAH/PSS)(ZnO/PSS) ₄ (PAH/PSS)	0.112 ± 0.022	30.5 ± 5.9

Ультразвуковую обработку микрокапсул производили с использованием установки Vandelin Sonopuls HD 200 (Германия), с частотой ультразвука 20 кГц и плотностью мощности 0.6 Вт/см². При таких параметрах основное действие

ультразвука связано с возникновением кавитации, которая, как было показано ранее, может вызывать нарушение целостности оболочек микрокапсул. Методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии было показано, что присутствие наночастиц ZnO в оболочке приводит к существенному увеличению чувствительности капсул к УЗ по сравнению с полиэлектролитными капсулами без наночастиц (Рис. 8).

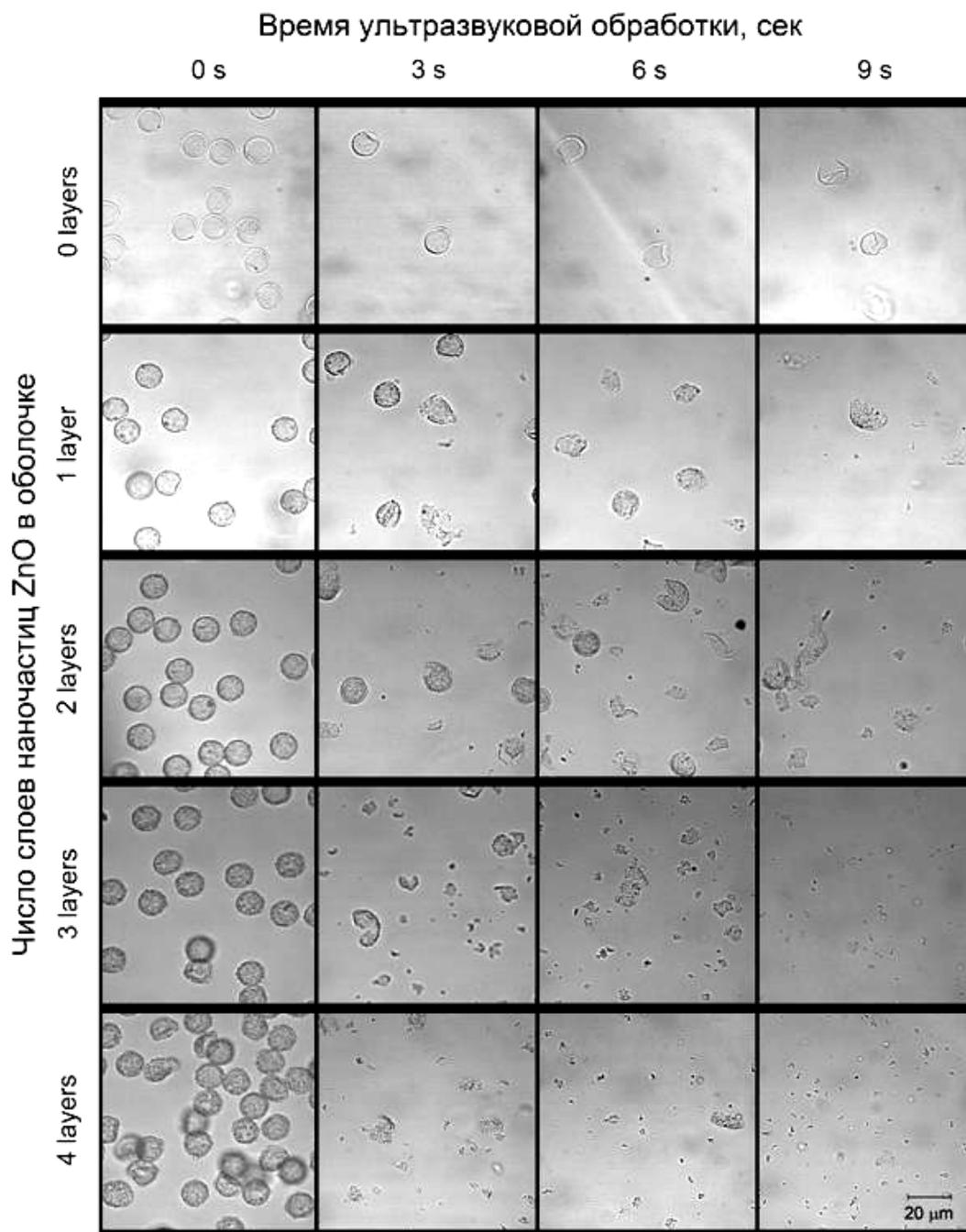


Рис. 8. Исследование влияния ультразвука на оболочки микрокапсул в зависимости от времени облучения и объемной фракции наночастиц ZnO (конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, режим просвета) [Л8].

Так, в результате действия ультразвука в течение нескольких секунд наблюдается лишь небольшая деформация оболочек полиэлектролитных капсул, тогда как ZnO-композитные капсулы (даже с одним слоем наночастиц) начи-

нают разрушаться уже через 3 сек после начала облучения, а 9 сек воздействия УЗ оказывается достаточно для полного разрушения оболочек ZnO-композитных капсул.

Обнаружено, что с увеличением числа стадий адсорбции наночастиц ZnO, т.е. с увеличением объемной фракции наночастиц в оболочке капсул, происходит уменьшение размера фрагментов оболочек, образовавшихся в результате их УЗ-обработки, следовательно, возрастает чувствительность капсул к ультразвуку. Кроме того, размер фрагментов оболочек микрокапсул зависит не только от объемной фракции наночастиц ZnO, но и от времени их облучения – размер фрагментов уменьшается с увеличением продолжительности УЗ-обработки. Это вызвано изменением механических свойств микрокапсул. Так, увеличение объемной фракции наночастиц ZnO приводит к уменьшению эффективного значения модуля Юнга, т.е. к уменьшению эластичности капсул. В результате повышается чувствительность микрокапсул к УЗ обработке.

Третья глава посвящена исследованию взаимодействия ZnO-композитных микрокапсул с клетками крови, их совместной реакции на облучение ультразвуком, а также зависимости протекания фагоцитоза от размера и состава оболочек микроконтейнеров. Так как все известные на данный момент работы по облучению капсул ультразвуком проводились в водной среде [6, Л4, Л8], то на начальном этапе исследования было изучено влияние свойств среды диспергирования на чувствительность микрокапсул к ультразвуку. В качестве модельной среды, свойства которой наиболее близки к физиологическим, был выбран фосфатно-солевой буфер (PBS). Изучения влияния вязкости и химического состава дисперсной среды на чувствительность капсул к ультразвуку проводили в плазме крови.

Эксперимент проводили с использованием 10-мкм микрокапсул (PAN/PSS)₂(ZnO/PSS)₃(PAN/PSS). Облучение капсул ультразвуком осуществлялось посредством ультразвуковой установки Bandelin Sonopuls HD 200 (Германия) (20 кГц, 0.6 Вт/см²). Отмечалось незначительное снижение чувствительности ZnO-композитных микрокапсул к ультразвуку в PBS и плазме крови по сравнению с результатами, полученными в водной среде [Л8, Л11].

На следующем этапе микрокапсулы подвергали ультразвуковой обработке в присутствии клеток крови. Исследование взаимодействия капсул с живыми клетками целесообразно проводить на примере клеток крови, так как при использовании микрокапсул в качестве средств адресной доставки и их дистанционном вскрытии в организме помредством ультразвука основное его влияние, в первую очередь, будет сказываться именно на кровеносной системе. Было установлено, что инкубация капсул с клетками крови в течение 30 и 60 минут при 37°C не вызывает повреждения и гибели последних и не приводит к гемолизу. Таким образом, было показано отсутствие негативного влияния 10-мкм капсул на клетки крови (что подтверждало их гемосовместимость).

Ультразвуковая обработка микрокапсул в присутствии клеток крови обнаружила, что ультразвук с частотой 20 кГц и плотностью мощности 0.6 Вт/см² оказывает разрушающее воздействие на 10-мкм микрокапсулы (PAN/PSS)₂(ZnO/PSS)₃(PAN/PSS) уже через 3 секунды после начала облучения и при этом

вызывает лишь частичное повреждение клеток крови (Рис. 9). При этом поврежденные и живые белые клетки крови присутствовали в образце как до, так и после УЗ-обработки. Маркирование оболочек микрокапсул производили с использованием декстрансульфата с молекулярной массой 4 кДа, меченного флуоресцентным красителем флуоресцеинизотиоцианатом (FITC). Окрашивание поврежденных клеток крови проводили с использованием флуоресцентного красителя пропидиум йодида (PI), который способен проникать через мембраны погибших и поврежденных клеток, связываться с ДНК и окрашивать ядра клеток.

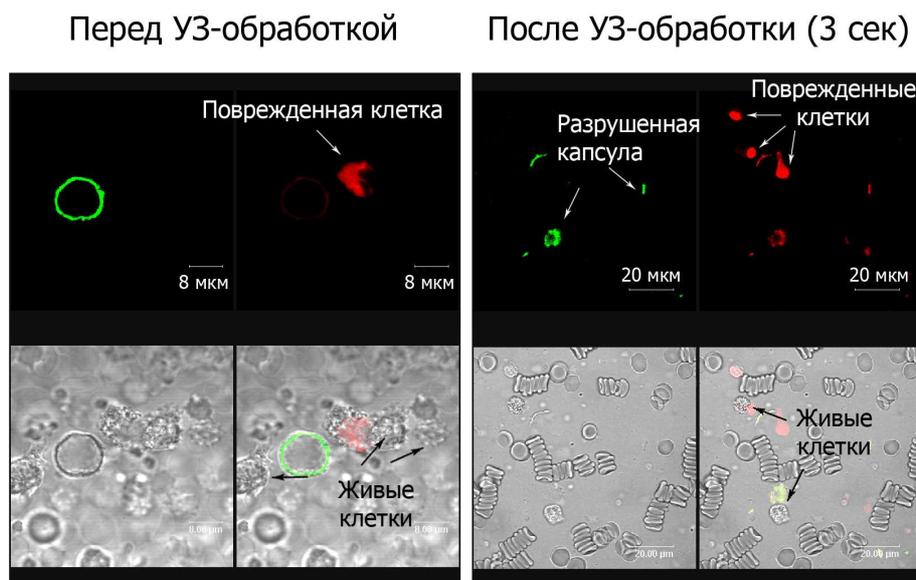


Рис. 9. Исследование микрокапсул с 3 слоями наночастиц ZnO в структуре оболочки в суспензии клеток крови до и после ультразвуковой обработки в течение 3 секунд (конфокальная лазерная saniрующая микроскопия) [Л11].

На дальнейшем этапе работы был исследован механизм взаимодействия клеток крови с микрокапсулами в зависимости от их размера (фагоцитоз капсул). Было показано отсутствие фагоцитоза капсул с диаметром ~ 10 мкм, так как максимальный размер объектов, способных участвовать в процессе фагоцитоза, составляет 5-7 мкм (Рис. 10).

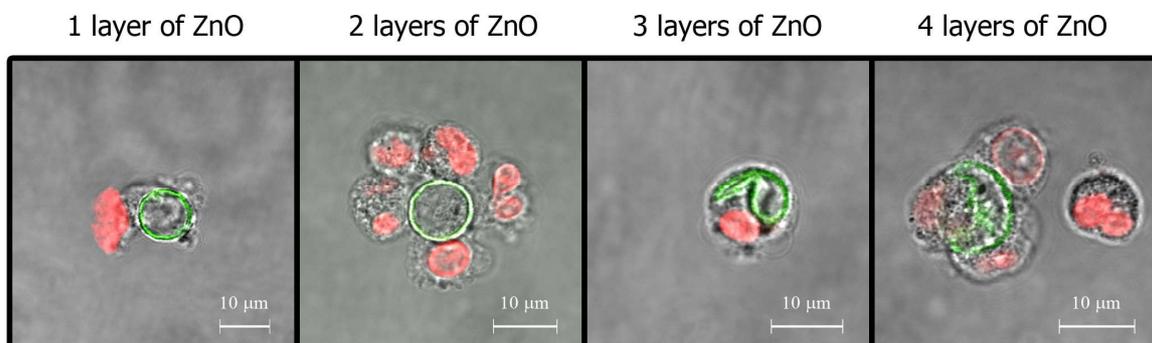


Рис. 10. Исследование процесса фагоцитоза ZnO-композитных 10-мкм микрокапсул в зависимости от числа слоев наночастиц ZnO в структуре их оболочек (конфокальная микроскопия, суперпозиция флуоресцентного и просвечивающего режимов) [Л11].

Однако, несмотря на превышение данного размера, в случае инкубации клеток крови с 10-мкм капсулами наблюдалась попытка их захвата фагоцитами. При этом встречались случаи объединения нескольких фагоцитов в группы. Следует отметить увеличение степени деформации оболочек микрокапсул фагоцитами в зависимости от числа слоев наночастиц ZnO в их оболочке (Рис. 10), что связано с изменением механических свойств микрокапсул, обнаруженным ранее.

Успешное протекание фагоцитоза было показано на примере микрокапсул (PAH/PSS)(ZnO/PSS)(PAH/PSS) диаметром 1 мкм, а также для фрагментов оболочек, оставшихся от 10-мкм капсул после их разрушения ультразвуком (Рис. 11). Метод конфокальной микроскопии позволяет качественно определять наличие фагоцитоза, однако не дает возможности получить точные данные о месторасположении микрокапсул после его завершения, так как они могут быть полностью поглощены клетками или же только закреплены на поверхности клеточных мембран.

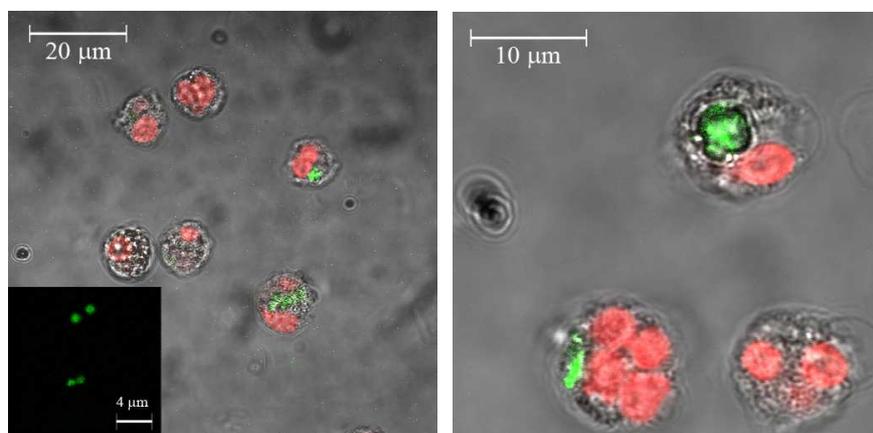


Рис. 11. Исследование процесса фагоцитоза ZnO-содержащих 1-мкм микрокапсул (слева), а также фрагментов оболочек, оставшихся от больших капсул после их разрушения ультразвуком (справа) (конфокальная микроскопия, суперпозиция флуоресцентного и просвечивающего режимов) [Л11].

Количественное исследование процесса фагоцитоза проводили методом проточной цитометрии при 37°C (физиологические условия, когда фагоциты активны) и 4°C (контрольный эксперимент) (Рис. 12). Анализ проводили по следующим основным параметрам – показателю прямого светорассеяния (FSC), который характеризует размеры клеток, и показателю бокового светорассеяния (SSC), который позволяет судить о соотношении размеров ядра и цитоплазмы клетки. Кроме того проводили одновременное считывание сигнала флуоресценции от маркированных оболочек микрокапсул и клеток крови. Анализ данных светорассеяния позволяет разделить лейкоциты периферической крови на три популяции – лимфоциты, моноциты и гранулоциты. Лимфоциты характеризуются наименьшими размерами, наиболее крупные клетки – гранулоциты, моноциты занимают промежуточное положение по параметрам FSC. Наиболее низкие характеристики SSC имеют лимфоциты, промежуточные – моноциты и высокие показатели SSC – у гранулоцитов.

Таблица 4. Численные результаты исследования фагоцитоза микрокапсул и фрагментов их оболочек белыми клетками крови человека методом проточной цитометрии [Л11].

	Разбавление	Гранулоциты		Моноциты	
		+37°C	+4°C	+37°C	+4°C
Капсулы 1 мкм	1:2	10.8	0.1	26.4	0
	1:5	4.8	0.4	15.7	0
	1:10	6.6	2.8	14.3	9.0
Фрагменты оболочек 10 мкм капсул	-	4.8	1.5	6.6	4.7

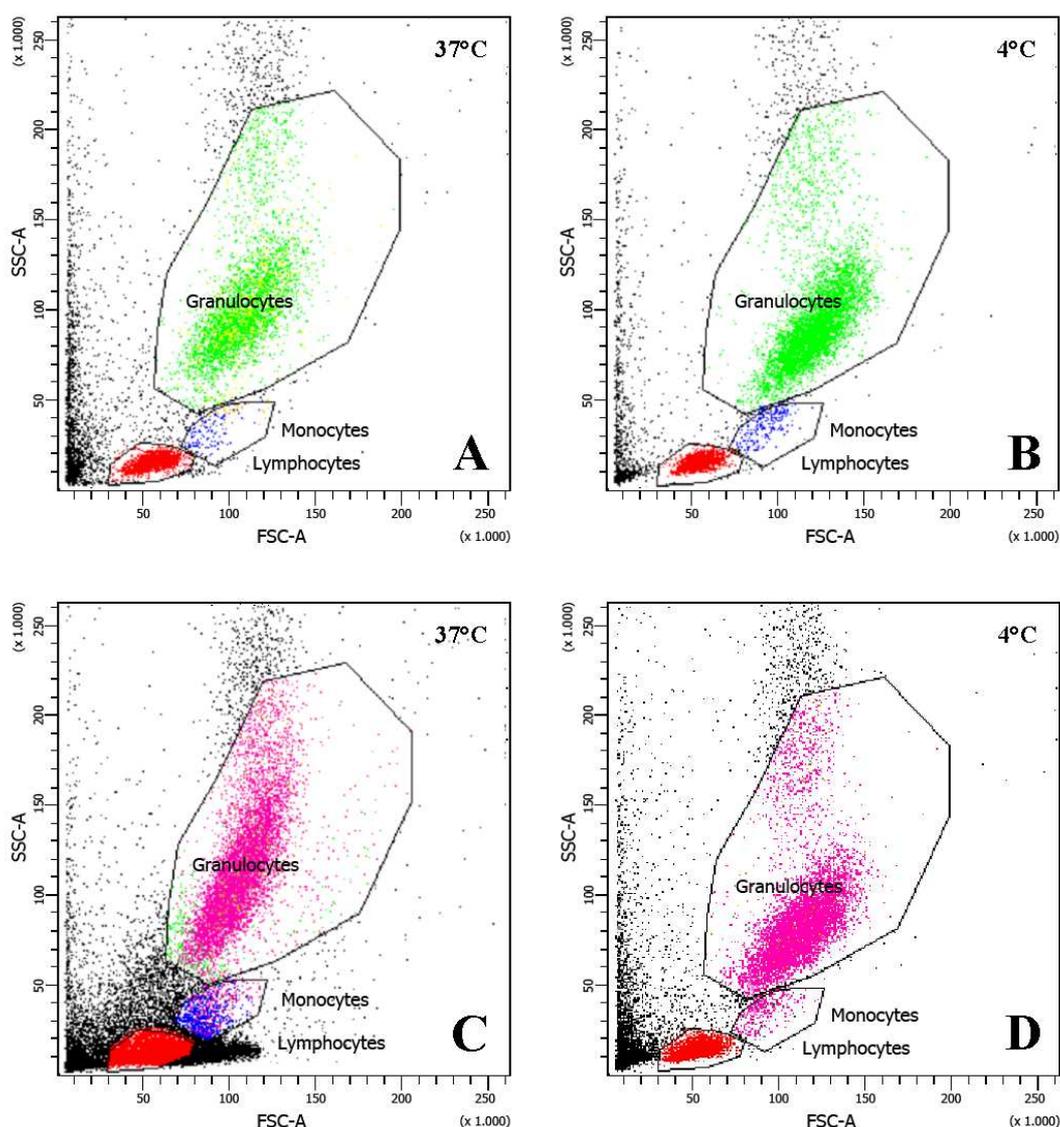


Рис. 12. Результаты исследования процесса фагоцитоза для ZnO-содержащих микрокапсул диаметром 1 мкм (А, В) и фрагментов оболочек 10-мкм капсул (С, D) при +37°C и +4°C [Л11].

Инкубация при низкой температуре препятствовала протеканию фагоцитоза и позволяла определить местоположение микрокапсул (поглощение клетками или закрепление на их поверхности). В таблице 4 приведены численные значения, соответствующие количеству клеток (гранулоцитов или моноцитов) в

процентах, поглотивших капсулы или фрагменты их оболочек. Результаты при 37°C показали успешное поглощение 1-мкм микрокапсул и фрагментов оболочек 10-мкм капсул. При этом исследование при низкой температуре обнаружило отсутствие закрепления капсул на поверхности клеток.

Таким образом, в данной части работы было обнаружено отсутствие фагоцитоза для ZnO композитных микрокапсул диаметром 10 мкм, возможность их разрушения ультразвуком в присутствии клеток крови, а также возможность использования явления фагоцитоза в качестве средства утилизации фрагментов оболочек микрокапсул, образовавшихся в результате их ультразвуковой обработки.

Четвертая глава посвящена исследованию токсичности микрокапсул и их составляющих компонент с использованием в качестве тест-систем гидробионтов (цериодафний (*Ceriodaphnia affinis*), люминесцентных генноинженерных бактерий *Escherichia coli*, 1885, M-17, личинок хирономид (*Chironomus riparius*) и аквариумных рыб *D. rerio*). Острое токсическое действие исследуемых токсикантов на гидробионтов оценивали по критерию выживаемости на основании величины полулетальной концентрации (ЛК₅₀) и безвредной концентрации (БК₁₀). Определение интегрального экотоксикологического показателя – класса опасности для окружающей природной среды (ОПС) – для всех тест-объектов производили в соответствии с критериями отнесения опасных отходов к классу опасности для окружающей среды

Расчет полулетальных (ЛК₅₀) и безвредных (БК₁₀) концентраций показал, что среди исследуемых веществ наибольшей токсичностью по отношению ко всем рассматриваемым тест-объектам обладает раствор поликатионного полиэлектролита РАН. Данный факт можно объяснить с точки зрения электростатического взаимодействия исследуемых полимеров и мембран клеток тестируемых объектов. Поскольку в большинстве случаев клеточные мембраны имеют отрицательный заряд, адгезия и дальнейшее взаимодействие с катионным полиэлектролитом (РАН) происходит более эффективно по сравнению с анионным полиэлектролитом (PSS) или незаряженным полимером. Так, PSS показал практическое отсутствие токсического действия на каждый выбранный тип тест-объекта.

При этом установлено, что наибольшей чувствительностью к действию катионного полиэлектролита РАН обладали цериодафнии (*Ceriodaphnia affinis*), для которых значение полулетальной концентрации ЛК₅₀₋₄₈ составило 0.34 мг/л. Личинки хирономид (*Chironomus riparius*) проявили максимальную резистивность по отношению к раствору РАН (ЛК₅₀₋₄₈ для них составляет 400 мг/л). Однако, при исследовании токсического действия наночастиц оксида (ZnO) установили, что на личинок хирономид наночастицы оказывали максимальное токсическое действие.

В ходе эксперимента было обнаружено, что ZnO-композитные микрокапсулы проявляют наименьшую токсичность среди всех тестируемых веществ. Это, во-первых, связано с наличием упорядоченного полиэлектролитного комплекса, который образуется в результате послойной адсорбции молекул противоположно заряженных полиэлектролитов при формировании оболочек микро-

капсул. Во-вторых, так как формирование оболочек микрокапсул завершается нанесением слоя отрицательно заряженных молекул PSS, то наличие преимущественно отрицательного заряда на поверхности капсул препятствует их электростатическому взаимодействию с мембранами клеток гидробионтов и приводит к снижению токсического действия. При этом встраивание наночастиц ZnO в структуру оболочек микрокапсул приводит к существенному снижению их токсичности по сравнению с наночастицами в коллоидном растворе.

Таким образом, обнаружено, что возможности полиионной сборки позволяют существенно снизить токсичность раствора катионного полиэлектролита РАН и наночастиц ZnO, выступающих в качестве составляющих компонентов оболочек нанокompозитных микрокапсул, что связано с формированием упорядоченной полиэлектролитной структуры, выступающей в качестве защитного покрытия.

В заключении сформулированы основные результаты и выводы, полученные в ходе выполнения диссертационной работы.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Ультразвук (27 кГц, 3.5 Вт/см²) оказывает разрушающее воздействие как на полиэлектролитные, так и на нанокompозитные микрокапсулы. Присутствие наночастиц магнетита (ζ -потенциал -12.5 ± 4 мВ, рН 7) в структуре оболочки повышает чувствительность капсул к ультразвуку по сравнению с капсулами без наночастиц. Увеличение общего числа полиэлектролитных слоев в оболочке микрокапсул приводит к снижению их чувствительности к ультразвуковой обработке, что объясняется ростом толщины их оболочек при увеличении числа циклов адсорбции полиэлектролитов. Увеличение числа циклов адсорбции наночастиц магнетита от 1 до 5 делает оболочку капсул более устойчивой к ультразвуковому воздействию.
2. На примере нанокompозитных микрокапсул, функционализированных наночастицами магнетита и углеродными нанотрубками, показано, что одного цикла адсорбции наночастиц магнетита достаточно для придания капсулам чувствительности к магнитному полю. Формирование плотной сетчатой структуры из углеродных нанотрубок на поверхности капсул обеспечивает увеличение их механической прочности и приводит к снижению чувствительности капсул к ультразвуку (27 кГц, 3.5 Вт/см²).
3. Встраивание наночастиц оксида цинка (ζ -потенциал $+36 \pm 5$ мВ, рН 7) в структуру оболочек микрокапсул приводит к существенному увеличению их чувствительности к ультразвуку (20 кГц, 0.6 Вт/см²) по сравнению с полиэлектролитными капсулами без наночастиц, а также микрокапсулами, функционализированными наночастицами магнетита. Для разрушения микрокапсул с наночастицами ZnO требуется гораздо более низкие мощности и время воздействия ультразвука (3-9 секунд), чем для капсул с наночастицами магнетита.
4. Изменение числа стадий адсорбции наночастиц ZnO от 1 до 4 приводит к увеличению объемной неорганической фазы в оболочке от 21 до 79%. При этом отмечается отсутствие существенных различий для микрокапсул с 3 и

4 слоями наночастиц ZnO, что говорит о «насыщении» оболочки наночастицами ZnO вследствие недостатка полиэлектролита, выступающего в качестве связующего компонента для их закрепления. Изменение механических свойств микрокапсул в зависимости от объемной фракции наночастиц ZnO в структуре оболочки (уменьшение жесткости и эффективного значения модуля Юнга (от 580 до 31 МПа) при увеличении числа стадий адсорбции наночастиц ZnO от 1 до 4) приводит к повышению чувствительности микрокапсул к ультразвуку.

5. Чувствительность к ультразвуку нанокомпозитных микрокапсул, модифицированных наночастицами ZnO, незначительно снижается при их облучении в средах с физиологическими свойствами (фосфатном буфере, плазме крови и крови) по сравнению с водой. Инкубация ZnO-композитных микрокапсул с клетками крови не вызывает повреждения и гибели клеток и не приводит к гемолизу эритроцитов. Установлена зависимость протекания фагоцитоза от размера фагоцитируемых ZnO-композитных микрокапсул: микрокапсулы большого диаметра (10 мкм) распознаются иммунной системой, однако фагоцитоз таких капсул отсутствует, в результате вероятность преждевременного уничтожения 10-мкм капсул иммунной системой организма мала, что открывает перспективы использования данных систем, например, в качестве контейнеров для адресной доставки. Микрокапсулы малого диаметра (1 мкм) и фрагментов оболочек, образовавшихся в результате ультразвуковой обработки 10-мкм капсул, успешно поглощаются фагоцитами, что открывает возможности использования фагоцитоза в качестве средства утилизации фрагментов оболочек микрокапсул.
6. Раствор поликатионного полиэлектролита полиалиламин гидрохлорида (ПАН), используемого в качестве составляющего компонента для формирования оболочки микрокапсул, обладает максимальной токсичностью по отношению к гидробионтам (цериодафниям (*Ceriodaphnia affinis*), люминесцентным генноинженерным бактериям *Escherichia coli*, 1885, M-17, личинкам хирономид (*Chironomus riparius*) и аквариумным рыбам *D. rerio*). Это связано с электростатическим взаимодействием катионного полимера с отрицательно заряженными клеточными мембранами тестируемых объектов. Формирование полиэлектролитного комплекса ПАН+PSS приводит к снижению токсического эффекта за счет нейтрализации зарядов молекул полиэлектролитов, участвующих в комплексообразовании. Возможности полиионной сборки позволяют существенно снизить токсичность наночастиц оксида цинка за счет их встраивания в структуру оболочек микрокапсул, что связано с формированием на их поверхности защитного покрытия из полиэлектролитных слоев. Наличие упорядоченной послойной структуры в оболочке микрокапсул $(\text{PAN/PSS})_2(\text{ZnO/PSS})_3(\text{PAN/PSS})$ проявляется также в минимальном токсическом действии на гидробионтов. При этом безопасная для гидробионтов концентрация микрокапсул в водной среде не превышает 250 мг/л.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Decher G. // *Science*. – 1997. – Vol. 277. – P. 1232-1237.
2. Sukhorukov G.B., Antipov A.A., Voigt A., Donath E., Möhwald H. // *Macromol. Rapid Commun.* – 2001. – Vol. 22. – P. 44-46.
3. Borodina T., Markvicheva E., Kunizhev S., Möhwald H., Sukhorukov G.B., Kreft O. // *Macromol. Rapid Commun.* – 2007. – Vol. 28. – N. 18-19. – P. 1894-1899.
4. Hu S.-H., Tsai C.-H., Liao C.-F., Liu D.-M., Chen S.-Y. // *Langmuir*. – 2008. – Vol. 24. – P. 11811-11818.
5. Bukreeva T.V., Parakhonsky B.V., Skirtach A.G., Susha A.S., Sukhorukov G.B. // *Crystallography Reports*. – 2006. – Vol. 51. – N. 5. – P. 863-869.
6. Shchukin D.G., Gorin D.A., Möhwald H. // *Langmuir*. – 2006. – Vol. 22. – P. 7400-7404.
7. Николаев А.Л., Гопин А.В., Божевольнов В.Е., Трещалина Е.М., Андропова Н.В., Мелихов И.В. // *Акустический журнал*. – 2009. – Т. 55. – № 4-5ю – С. 565-574.
8. Skirtach A.G., Javier A.M., Kreft O., Köhler K., Alberola A.P., Möhwald H., Parak W.J., Sukhorukov G.B. // *Angew. Chem.* – 2006. – Vol. 118. – P. 4728-4733.
9. Reddy K.M., Feris K., Bell J., Wingett D.G., Hanley C., Punnoose A. // *Appl. Phys. Lett.* – 2007. – Vol. 90. – P. 213902-1–213902-3.
10. Hanley C., Layne J., Punnoose A., Reddy K.M., Coombs I., Coombs A., Feris K., Wingett D. // *Nanotechnology*. – 2008. – Vol. 19. – P. 1-10.
11. Dong W., Ferri J., Adalsteinsson T., Schonhoff M., Sukhorukov G.B., Möhwald H. // *Chem. Mater.* – 2005. – Vol. 17. – P. 2603-2611.
12. Porcel C., Lavallo P., Ball V., Decher G., Senger B., Voegel J.-C., Schaaf P. // *Langmuir*. – 2006. – Vol. 22. – P. 4376-4383.
13. Fery A., Weinkamer R. // *Polymer*. – 2007. – Vol. 48. – P. 7221-7235.
14. Terentyuk G.S., Maslyakova G.N., Suleymanova L.V., Khlebtsov B.N., Kogan B.Ya., Akchurin G.G., Shantrocha A.V., Maksimova I.L., Khlebtsov N.G., Tuchin V.V. // *Journal of Biophotonics*. – 2009. – Vol. 2. – N. 5. – P. 292-302.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- Л1. Портнов С.А., Яценко А.М., Губский А.С., Горин Д.А., Невешкин А.А., Климов Б.Н., Ломова М.В., **Колесникова Т.А.** Автоматизированная установка для получения нанокомпозитных покрытий методом полиионной сборки // Федеральная школа-конференция по инновационному малому предпринимательству в приоритетных направлениях науки и высоких технологий. Сборник материалов докладов. – М., РГУИТП. – 2006. – С. 22-27.
- Л2. Портнов С.А., Иноземцева О.А., **Колесникова Т.А.**, Ломова М.В., Хлебцов Б.Н., Горин Д.А. Нанокompозитные микрокапсулы и перспективы их применения в медицине // Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине: Материалы ежегодной Всероссийской научной школы-семинара. Под ред. Проф. Д.А. Усанова – Саратов: Изд-во Саратовского университета. – 2007. – С. 140-143.
- Л3. Портнов С.А., Иноземцева О.А., Горин Д.А., **Колесникова Т.А.** Формирование и физико-химические свойства полиэлектролитных нанокompозитных микрокапсул // Российские нанотехнологии. – 2007. - Т. 2. – №9-10. – С. 68-80.
- Л4. **Колесникова Т.А.**, Горин Д.А., Хлебцов Б.Н., Щукин Д.Г. Характеризация чувстви-

тельных к ультразвуковому воздействию нанокomпозитных микрокапсул методом атомно-силовой микроскопии // Российские нанотехнологии. – 2008. – Т. 3. – № 9-10. – С. 48-57.

- Л5. Климов Б.Н., Штыков С.Н., Горин Д.А., Иноземцева О.А., Глуховской Е.Г., Ященко А.М., **Колесникова Т.А.** Физико-химия наноструктурированных материалов // Учебное пособие для студентов факультета нано- и биомедицинских технологий Саратовского государственного университета. Под ред. Климова Б.Н., Штыкова С.Н. – Саратов: Изд-во «Новый ветер». 2009. 218 с. ISBN 978-5-98116-055-4.
- Л6. **Колесникова Т.А.**, Хлебцов Б.Н., Горин Д.А., Шукин Д.Г. Создание чувствительных к ультразвуковому воздействию полиэлектролитных микрокапсул, функционализированных наночастицами магнетита // 1-я Международная научная школа - Нано 2009. Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах. Сборник материалов докладов. Московская область. 2009. с. 246-249.
- Л7. Gorin D.A., Yashchenok A.M., Manturov A.O., **Kolesnikova T.A.**, Möhwald H. Effect of Layer-by-Layer electrostatic assemblies on the surface potential and current voltage characteristic of MIS structures // *Langmuir*. – 2009. – Vol. 25. – N. 21. – P. 12529-12534.
- Л8. **Kolesnikova T.A.**, Gorin D.A., Fernandes P., Kessel S., Khomutov G.B., Fery A., Shchukin D.G., Möhwald H. Nanocomposite Microcontainers with High Ultrasound Sensitivity // *Advanced Functional Materials*. – 2010. – Vol. 20. – P. 1189-1195.
- Л9. Inozemtseva O.A., Portnov S.A., **Kolesnikova T.A.**, Gorin D.A., Sukhorukov G.B. Layer by Layer microencapsulate technology as basis for fabrication of drug delivery nanosystems with remote controlling properties // *Handbook of Materials for Nanomedicine (Vol. 1, Chapter 3)* by Vladimir Torchilin & Mansoor M. Amiji. World Scientific Pub Co. in English. 2010. 840 p. ISBN-10: 9814267554, ISBN-13: 978-9814267557.
- Л10. **Колесникова Т.А.**, Георгиева Р., Горин Д.А., Шукин Д.Г., Мевальд Х. Формирование высокочувствительных к ультразвуковой обработке нанокomпозитных микрокапсул с наночастицами оксида цинка в структуре оболочки и их взаимодействие с клетками крови // Сборник материалов научного семинара стипендиатов программ «Михаил Ломоносов II» и «Иммануил Кант II» 2009/2010 года. Москва, 2010. – 4 с.
- Л11. Акчурин Г.Г., Акчурин Г.Г., Горин Д.А., **Колесникова Т.А.**, Портнов С.А., Скиртач А.Г., Сухоруков Г.Б., Хлебцов Б.Н., Хлебцов Н.Г. Способ селективного разрушения раковых клеток с помощью магнитных микроконтейнеров с фотодинамическими или фототермическими красителями // Положительное решение о выдаче патента на изобретение №2009106672/14(008911) Российской Федерации, опубл. 01.04.2010, Бюл. №95. – 5 с. (Приор. от 25.02.2009).