

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Мусин Егор Валиевич

**Изучение физико-химических свойств
полиэлектролитных микрокапсул и разработка
технологии их разрушения для создания
микроконтейнеров**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена на кафедре синтетической биологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова и в лаборатории роста клеток и тканей ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН»

Научный руководитель: – *Тихоненко Сергей Алексеевич*
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты: – *Марквичева Елена Арнольдовна* – доктор химических наук, ФГБУН Институт биорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, отдел биоматериалов и бионанотехнологий, лаборатория биомедицинских материалов, главный научный сотрудник

Букреева Татьяна Владимировна – доктор химических наук, доцент, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Институт кристаллографии имени А.В. Шубникова РАН, отдел рентгеновских и синхротронных исследований, заведующая лабораторией биорганических структур

Садыкова Вера Сергеевна – доктор биологических наук, доцент, ФГБНУ "Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе", заместитель директора по научной работе, отдел микробиологии, заведующая лабораторией таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов

Защита диссертации состоится «31» октября 2023 г. в 17:00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.015.2 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12, биологический факультет, аудитория М-1

Тел. 8(495)939-35-46, e-mail: nvkostina@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.2/2631>

Автореферат разослан «27» сентября 2023 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета МГУ.015.2, к.б.н.

Н.В. Костина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования.

Развитие прикладной биотехнологии и медицины приводит к появлению новых высокоэффективных лекарств, чувствительных биосенсоров и рекомбинантных ферментов. Увеличение эффективности их применения возможно за счёт создания микроконтейнеров, способных обеспечить защиту инкапсулированного объекта от воздействия агрессивной внешней среды, его доставку и контролируемое высвобождение. К микроконтейнерам относятся липосомы (Sercombe et al., 2015), фуллерены (Zakharian et al., 2005), микрокапсулы из нейлона (Chang, 1976), человеческого альбумина (Longo, Goldberg, 1985), фармакоциты на основе клеток человека и животных (Бегдуллаев и др., 2008; Цой и др., 2012). Одними из перспективных многофункциональных микроконтейнеров являются полиэлектролитные микрокапсулы.

Полиэлектролитные микрокапсулы (ПМК) впервые были получены в 1998 и с тех пор они являются активно изучаемым объектом полимерной нанотехнологии (Caruso, 1998; Donath et al., 1998). Они изготавливаются методом поочерёдной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов на микрочастицу твёрдого носителя, с её последующим удалением. Получаемые таким образом ПМК могут быть от нескольких нанометров (Maуа et al., 2003) до десятков микрон (Shenoy et al., 2003).

Спектр возможного применения полиэлектролитных микрокапсул включает адресную доставку лекарств (del Mercato et al., 2010; Namdee et al., 2014), а также их пролонгированное и контролируемое высвобождение (Muñoz Javier et al., 2008; Pavlov et al., 2011; She et al., 2012). Ведутся работы по созданию на основе ПМК диагностических систем для определения pH среды (Song et al., 2014) и концентрации низкомолекулярных соединений (Kazakova et al., 2013). Активно изучается возможность создания средств тераностики на основе ПМК, содержащих квантовые точки, для борьбы с онкологическими заболеваниями (Nifontova et al., 2018).

Однако, невзирая на перспективы применения микрокапсул, не изученными остаются многие свойства и особенности структуры ПМК, что существенно ограничивает их широкое применение. Так, несмотря на исследования ультраструктурной организации ПМК (Kazakova et al., 2007), до сих пор не выясненными остаются многие особенности взаимного расположения полиэлектролитов в их составе. Распределение полиэлектролита в структуре микрокапсулы может оказывать влияние на поверхностный заряд микроконтейнера, который необходимо учитывать при взаимодействии микрокапсул с клетками и для их закрепления на различных поверхностях.

Для применения ПМК, важным является изучение влияния факторов среды на

стабильность микрокапсул и динамику высвобождения инкапсулированных веществ. От таких параметров, как ионная сила и температура, зависит плотность полиэлектролитных слоев, а, следовательно, они могут оказать влияние на скорость потери микрокапсулой полиэлектролита и инкапсулированного белка.

Неизвестным и требующим изучения является влияние ПМК на буферную ёмкость среды, в частности, буферные свойства микрокапсул не учитываются при создании pH биосенсоров на их основе, что может приводить к неправильной интерпретации результатов исследований (Antipina et al., 2009; Kazakova et al., 2011; Abu-Thabit, 2018). Буферные свойства микрокапсул в перспективе можно применить для защиты металлических поверхностей от коррозии (Zheludkevich et al., 2007; Skorb et al., 2009; Andreeva et al., 2010) и защиты органических молекул от pH-опосредованной дегградации (Andreeva et al., 2017).

Для расширения существующих возможностей ПМК и поиска новых путей применения их в качестве микроконтейнеров, также требуется создание новых способов контролируемого вскрытия микрокапсул и высвобождения из них веществ. Особый интерес представляют системы запрограммированной декапсуляции, не требующие применения дополнительного оборудования и способные разрушить ПМК в ответ на определённые условия среды.

Таким образом, для создания микроконтейнеров на основе ПМК необходимо провести исследование их свойств, организации полиэлектролитных слоев, а также разработать способ их разрушения для высвобождения веществ.

Цель работы: изучение физико-химических свойств полиэлектролитных микрокапсул и разработка технологии их разрушения для создания микроконтейнеров на их основе.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать десорбцию полиэлектролита микрокапсул, полученных на сферолите CaCO_3 и составном сферолите CaCO_3 -белок, в зависимости от ионной силы и температуры среды.
2. Исследовать динамику высвобождения белка из микрокапсул, полученных на сферолите CaCO_3 и составном сферолите CaCO_3 -белок, в зависимости от ионной силы и температуры среды
3. Исследовать организацию полиэлектролитных слоев в микрокапсулах, полученных на разных носителях.
4. Исследовать буферную ёмкость полиэлектролитных микрокапсул, в зависимости от ионной силы и температуры среды.
5. Разработать технологию разрушения микрокапсул и декапсуляции вещества из них.

Объектами исследования являются полиэлектролитные микрокапсулы на основе полиэлектролитов полистиролсульфоната и полиаллиламина, полученные на сферолите CaCO_3 и составном сферолите CaCO_3 -белок. В качестве модельного белка использован бычий сывороточный альбумин.

Предметом исследования являлось изучение стабильности и способности микрокапсул удерживать инкапсулированное вещество в различных условиях; организация полиэлектролитных слоев микрокапсул в зависимости от частицы, выбранной в качестве ядра для приготовления; буферная ёмкость микрокапсул. Также предметом исследования являлась разработка нового способа разрушения микрокапсул.

Научная новизна работы

Установлено, что увеличение ионной силы среды снижает стабильность полиэлектролитных микрокапсул за счёт увеличения десорбции полимера из их состава. Повышение температуры среды увеличивает стабильность микрокапсул, приготовленных на составном сферолите CaCO_3 -белок, но не влияет на стабильность капсул, приготовленных на CaCO_3 сферолите. Показано отсутствие десорбции полиэлектролита при 5°C независимо от ионной силы среды.

Установлено, что белок не выходит из микрокапсул, приготовленных на составном сферолите CaCO_3 -белок, независимо ионной силы раствора и температуры среды. В случае капсул, приготовленных на CaCO_3 сферолите и загруженных белком методом сорбции, высвобождение белка происходит с возрастанием ионной силы раствора и не зависит от температуры.

Обнаружено перемешивание полиэлектролитных слоев в ходе приготовления ПМК, которое особенно выражено у микрокапсул, изготовленных на CaCO_3 сферолите. В результате этого перемешивания нарушается соответствие заряда поверхности микрокапсул заряду внешнего слоя полиэлектролита.

Выявлена собственная буферная ёмкость микрокапсул, обусловленная количеством не связанных групп ПАА и показана её зависимость от температуры и ионной силы среды.

Разработана новая технология разрушения полиэлектролитных микрокапсул, с применением инкапсулированных бактериальных спор *B.subtilis*. Технология может быть применена для высвобождения инкапсулированных веществ из микроконтейнеров на основе ПМК.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Полученные результаты расширяют знания о свойствах и организации полиэлектролитных слоев микрокапсул. Они могут быть использованы для правильного подбора типа микрокапсул при создании микроконтейнеров различного назначения, предсказания скорости высвобождения из них вещества и десорбции полимера в различных условиях. Данные о перемешивании полиэлектролитных слоев ПМК и зависимости их поверхностного заряда от внешнего слоя, необходимо учитывать при закреплении микрокапсул и предсказания их взаимодействия с клетками. Данные о влиянии микрокапсул на буферную ёмкость среды важно учитывать при создании на основе микрокапсул рН чувствительных сенсоров, интерпретации результатов их работы и определения их чувствительности. Эти же данные могут быть использованы при описании объекта и понимания интерполиэлектролитного взаимодействия внутри микрокапсул.

Новая технология разрушения ПМК и декапсуляции веществ, на основе бактериальных спор *B.subtilis*, может стать основой для создания новой формы лекарственного средства.

Методология и методы исследования.

В качестве частиц-ядер для формирования полиэлектролитных микрокапсул использовались микросферолиты карбоната кальция (Antipov et al., 2003). Для формирования микрокапсул использовались полиэлектролиты полиаллиламина (ПАА) 70 кДа, «Aldrich» (Германия) и полистиролсульфоната (ПСС) 70 кДа, «Aldrich» (Германия). В качестве белка выбран бычий сывороточный альбумин (БСА) «Sigma» (Германия). Для разработки технологии декапсуляции применялись бактериальные споры *B.subtilis* ВКМ В-501Т (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, Россия). Для инкапсуляции использовался один из двух методов: метод копреципитации (Petrov et al., 2008) и метод адсорбции (Kochetkova et al., 2013). Оценка количества отслоившегося полиэлектролита и высвободившегося вещества производилась методом флуоресцентной спектроскопии. Заряд микрокапсул определялся с помощью прибора Zetasizer nano ZS (UK). Для оценки влияния ПМК на буферную ёмкость среды, титрование проводилось путём ручного измерения с помощью рН-метра Hanna рН 211, с последующим расчётом буферной ёмкости в моль/л (Richard et al., 2013). Значимость различий кривых титрования проверялась с использованием критерия Манна-Уитни (Mann, Whitney, 1947).

Положения, выносимые на защиту:

1. Десорбция полиэлектролита ПМК возрастает с увеличением ионной силы среды. Повышение температуры до 37°C не влияет на стабильность микрокапсул, полученных на сферолитах CaCO₃, но снижает потерю полиэлектролита микрокапсул полученных на составных сферолитах CaCO₃-белок.
2. Ионная сила среды и температура не оказывают влияние на высвобождение белка из микрокапсул, полученных на составных сферолитах CaCO₃-белок. Высвобождения белка из таких микрокапсул не происходит. Из микрокапсул, полученных на сферолитах CaCO₃, заполненных белком после приготовления методом сорбции, выход белка возрастает с увеличением ионной силы среды и не зависит от температуры.
3. Поверхностный заряд полиэлектролитных микрокапсул с нерастворённым CaCO₃ ядром, соответствует заряду внешнего полиэлектролитного слоя. При растворении CaCO₃ ядра происходит перемешивание полиэлектролитных слоев микрокапсул и нарушение зависимости заряда ПМК от заряда внешнего слоя полиэлектролита. У микрокапсул, полученных на составных сферолитах CaCO₃-белок, перемешивание выражено меньше, чем у микрокапсул, полученных на сферолитах CaCO₃.
4. Полиэлектролитные микрокапсулы обладают буферной ёмкостью, что обусловлено несвязанными участками полиаллиламина в их составе. Увеличение буферной ёмкости происходит с ростом в среде концентрации соли, но снижается при повышении температуры, что связано с изменением количества свободных участков ПАА.
5. На основе инкапсулированных спор *B.subtilis* разработана технология разрушения полиэлектролитных микрокапсул и декапсуляции веществ из них для создания микроконтейнеров.

Личный вклад автора. Автором был самостоятельно спланирован и проведён комплекс теоретических и экспериментальных исследований, собраны и обработаны все полученные результаты, а также подготовлены к печати публикации. Работы по созданию бактериальной системы декапсуляции и разрушения микрокапсул были проведены в сотрудничестве со Всероссийской коллекцией микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов определяется значительным объёмом проведённых исследований, использованием в работе современных экспериментальных, статистических и биофизических методов. Достоверность результатов также подтверждается публикациями в рецензируемых отечественных и международных журналах. Результаты диссертации были представлены на следующих российских и международных конференциях: "Биология - наука 21 века" (Пушино, 2016), XVI Всероссийская конференция молодых учёных «Экспериментальная и теоретическая биофизика» (Пушино, 2016), «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2017, 2018, 2019), «Ломоносов-2017» и «Ломоносов-2021» (Москва, 2017, 2021).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в наукометрических базах данных Web of Science и/или Scopus. В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Структура работы. Работа состоит из следующих разделов: «Введение», «Список сокращений», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», и «Список литературы». Работа изложена на 108 страницах, содержит 21 рисунок и 2 таблицы. Список цитируемой литературы включает 246 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы рассмотрены современные подходы к созданию и применению микроконтейнеров. Описаны различные типы микроконтейнеров и актуальные исследования инкапсуляции в них различных веществ. Подробно описаны полиэлектролитные микрокапсулы и их различия в зависимости от выбранного ядра-носителя при приготовлении. Отдельное внимание в обзоре уделяется аспектам практического применения микрокапсул, в частности влиянию на микрокапсулы факторов среды и способам контролируемого разрушения микрокапсул, для высвобождения веществ из них.

Глава 2. Результаты и обсуждение

Изучение стабильности микрокапсул

Применение полиэлектролитных капсул в качестве микроконтейнеров невозможно без изучения их стабильности в различных средах. Существенное влияние на десорбцию полимера и, как следствие, на стабильность микрокапсул могут оказать такие параметры среды, как ионная сила и температура. Влияние ионной силы среды на ПМК может быть обусловлено экранированием ионами соли заряженных групп полиэлектролитов (Büscher et al., 2002) (Antipov et al., 2002), что способно ослабить полиэлектролит-полиэлектролитную связь, привести к разрыхлению микрокапсул и тем самым снизить их стабильность. Влияние температуры проявляется в уплотнение микрокапсул, при их нагреве (Köhler and Sukhorukov, 2007). Этот процесс сопровождается уменьшением диаметра ПМК и увеличением плотности полиэлектролитной оболочки, что связано с увеличением подвижности полимерных цепей и их взаимопроникающей диффузией (Soltwedel et al., 2010).

Структура и многие особенности микрокапсул зависят от микрочастицы-носителя, выбранной в качестве ядра. Схематично, метод приготовления ПМК представлен на рисунке 1. При использовании в качестве микрочастиц CaCO_3 сферолита (мезопористых сфер ватерита), полиэлектролиты проникают в пористую структуру ядра и после разрушения сферолита формирует капсулу состоящую из интерполиэлектролитного комплекса (Дубровский и др., 2008) (рис. 1А). Инкапсуляция веществ в такие микрокапсулы осуществляется методом сорбции, при инкубации готовых капсул в растворе требуемого препарата (Kochetkova et al., 2013). При формировании микрокапсул на составном сферолите CaCO_3 -белок, внутреннее пространство микрокапсул становится заполнено инкапсулированным белком после растворения ядра (Дубровский и др., 2008) (рис. 1Б). Для создания составного

сферолита, CaCO_3 сферолит формируют слиянием Na_2CO_3 и CaCl_2 в растворе требуемого вещества (метод копреципитации) (Kochetkova et al., 2013).

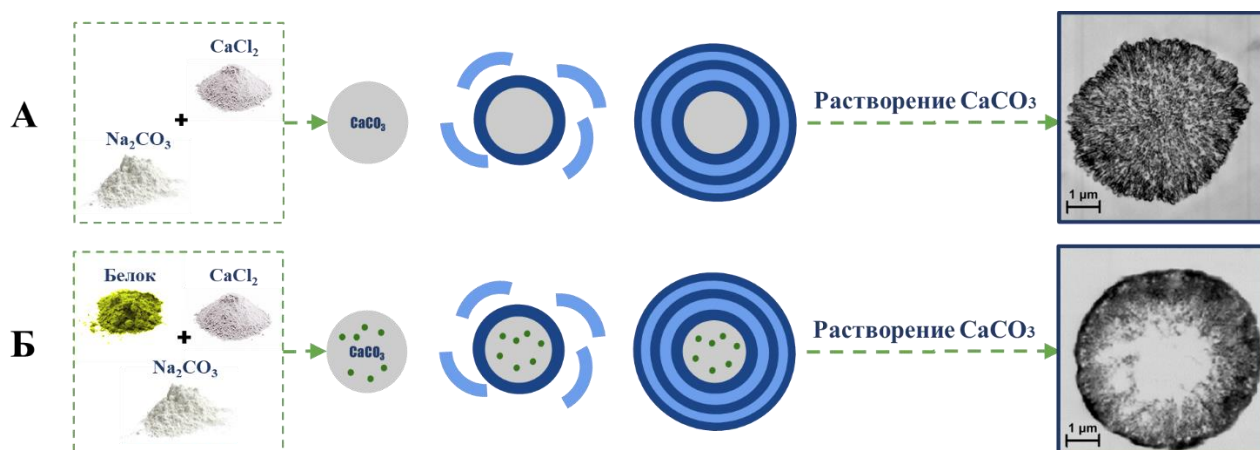


Рисунок 1. Схема приготовления полиэлектролитных микрокапсул, А- формирование на CaCO_3 сферолите, Б- формирование на составном сферолите CaCO_3 -белок

Для изучения стабильности микрокапсул в различных условиях измерялось количество полиэлектролита, отслоившегося от внешней поверхности микрокапсул. Исследовались полиэлектролитные микрокапсулы 2-х типов: полученных на CaCO_3 сферолите и на составном сферолите CaCO_3 -белок, внешний слой которых был представлен полиаллиламином меченым флуоресцеин изотиоцианатом (ФИТЦ-ПАА). Капсулы инкубировались при температуре 5°C , 22°C и 37°C , в $0,2\text{M NaCl}$, 2M NaCl и $0,1\text{M } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Десорбция полимера оценивалась спектрофотометрически, по количеству ФИТЦ-ПАА, вышедшему в раствор инкубации.

Показано, что для микрокапсул, полученных на составном сферолите CaCO_3 -белок, наибольшее количество отслоившегося полимера, а, следовательно, и степень разрушения капсулы, наблюдались при 22°C , в растворе 2M хлорида натрия, так за 500 часов инкубации, от внешнего слоя отделилось до 20% полимера (рис. 2). Эффект объясняется электростатическим экранированием сульфогрупп и аминогруппы полиэлектролитов ионами соли. Растворы $0,1\text{M}$ сульфата аммония и $0,2\text{M}$ хлорида натрия имеющие одинаковую ионную силу вызывают примерно равную степень разрушения, таким образом сделан вывод о том, что, если ионы влияют на диссоциацию полиэлектролитов, это связано не с конкурентным связыванием сульфогрупп соли с аминогруппами полиэлектролита, а с электростатической природой взаимодействия. Инкубация при физиологических значениях 37°C демонстрирует меньшее количество полиэлектролита, вышедшего в раствор. Увеличение стабильности таких микрокапсул при нагреве может быть объяснено тем, что оболочка микрокапсул уплотняется при нагреве, а количество несвязанных между собой участков полиэлектролитов в ней становится меньше (Köhler, Sukhorukov, 2007).

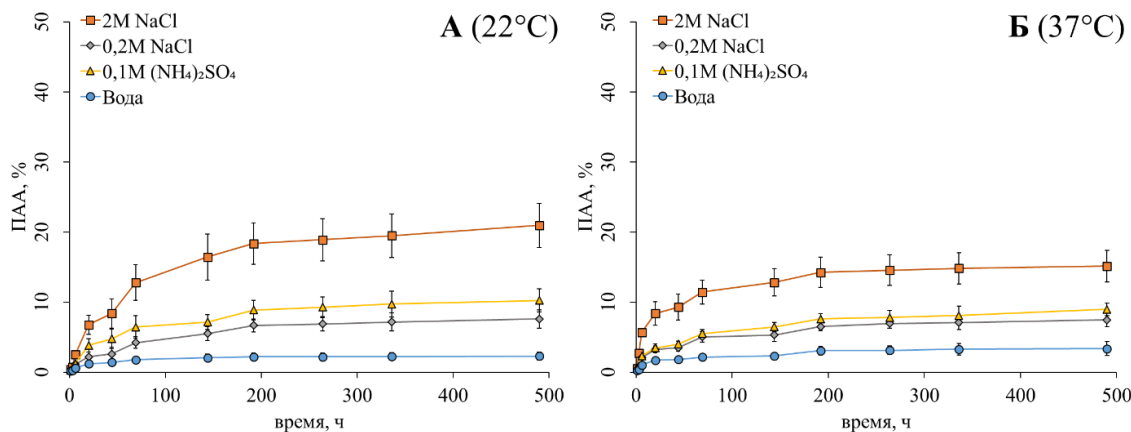


Рисунок 2. Зависимость концентрации ФИТЦ меченого ПАА в супернатанте от времени инкубации полиэлектролитных микрокапсул, полученных на составном сферолите CaCO₃-белок, при 22° С (А) и при 37°С (Б), в присутствии солей

Для микрокапсул, полученных на CaCO₃ сферолите, наибольший уровень отделившегося полиэлектролита также зарегистрирован в 2М хлорида натрия (35% от внешнего слоя) (рис. 3). В растворах 0,1М сульфат аммония и 0,2М хлорид натрия одинаковой ионной силы также наблюдается одинаковое количество отслоившегося полимера. При этом, в случае капсул, полученных на CaCO₃, температура на процесс десорбции влияния не оказала. Это может быть объяснено тем, что такие микрокапсулы не имеют выраженной внешней оболочки, способной к уплотнению.

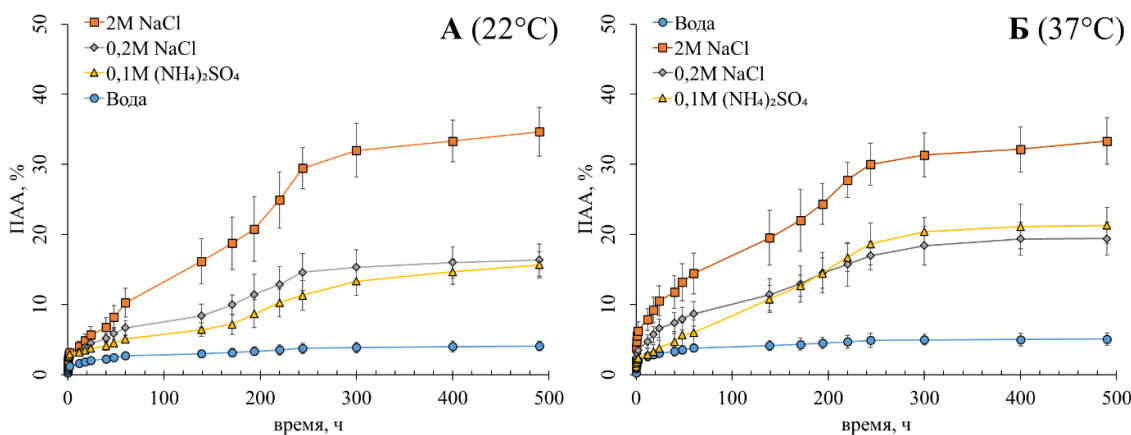


Рисунок 3. Зависимость концентрации ФИТЦ меченого ПАА в супернатанте от времени инкубации полиэлектролитных микрокапсул, полученных сферолите CaCO₃, при 22° С (А) и при 37°С (Б), в присутствии солей

Исследования стабильности микрокапсул при 5°С показали, что микрокапсулы не разрушаются в присутствии ни одной из исследуемых солей, что может быть связано с падением подвижности полиэлектролитных цепей при этой температуре.

Динамика высвобождения инкапсулированного белка

Как показано выше, температура инкубации и присутствие в растворе солей в различных концентрациях, оказывает влияние на электростатические связи в ПМК, таким образом следующим этапом работы стало изучение влияния этих факторов на динамику высвобождения из микрокапсул инкапсулированного белка.

Исследовались полиэлектролитные микрокапсулы 2-х типов: полученные составном сферолите CaCO_3 -белок и на CaCO_3 сферолите, содержащие бычий сывороточный альбумин меченный флуоресцеин изотиоцианатом (ФИТЦ-БСА), в количестве 1 мг на исследуемую порцию. Регистрация вышедшего белка производилась спектрофотометрически, во время инкубации микрокапсул при температуре 22°C и 37°C , в присутствии 0,2М и 2М NaCl.

Выход белка из капсул, полученных на составном сферолите CaCO_3 -белок примерно равный во всех изученных условиях, и не превышает 0,3% от его содержания (рис. 4). Это позволяет сделать вывод о фактическом отсутствие выхода белка.

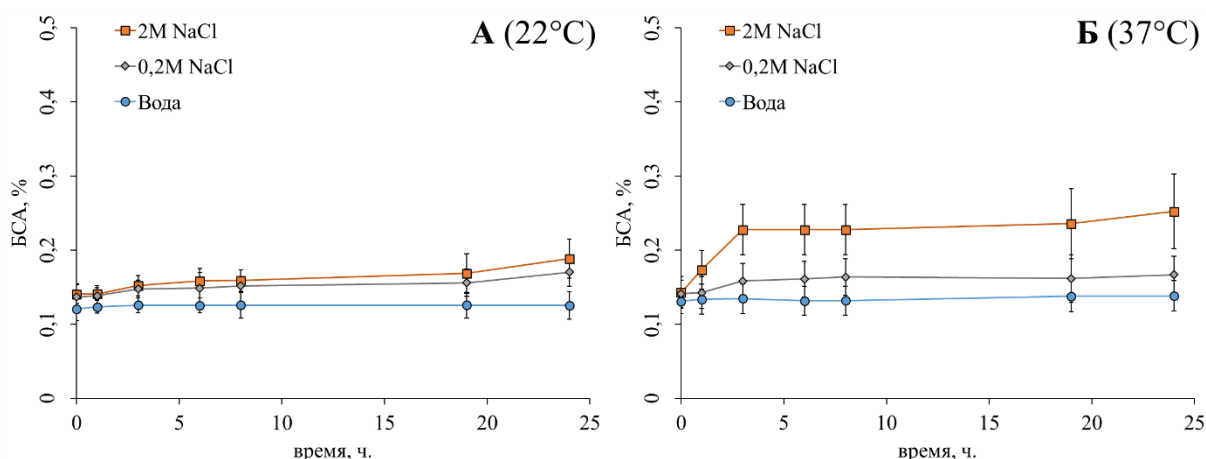


Рисунок 4. Зависимости высвобождения БСА в супернатанте от времени инкубации полиэлектролитных микрокапсул, полученных на составном сферолите CaCO_3 -белок в присутствии солей, при 22°C (А) и при 37°C (Б)

Для изучения выхода белка из капсул, полученных на сферолите CaCO_3 , капсулы были заполнены белком после приготовления, методом сорбции. Установлено, что выход белка зависит от ионной силы раствора, и возрастает от 20% в 0,2М до 70% в 2М хлорида натрия. В воде это значение не превышает 8% (рис. 5). Это позволяет сделать вывод о преимущественно электростатическом характере удержания белка в таких капсулах. Выход белка прекращается в первые 6 часов инкубации, что может быть связано со стабилизацией микрокапсулы и установлением равновесного состояния между полиэлектролитами и ионами соли. Температура среды на процесс высвобождения белка из микрокапсул, полученных на сферолите CaCO_3 , влияния не оказала.

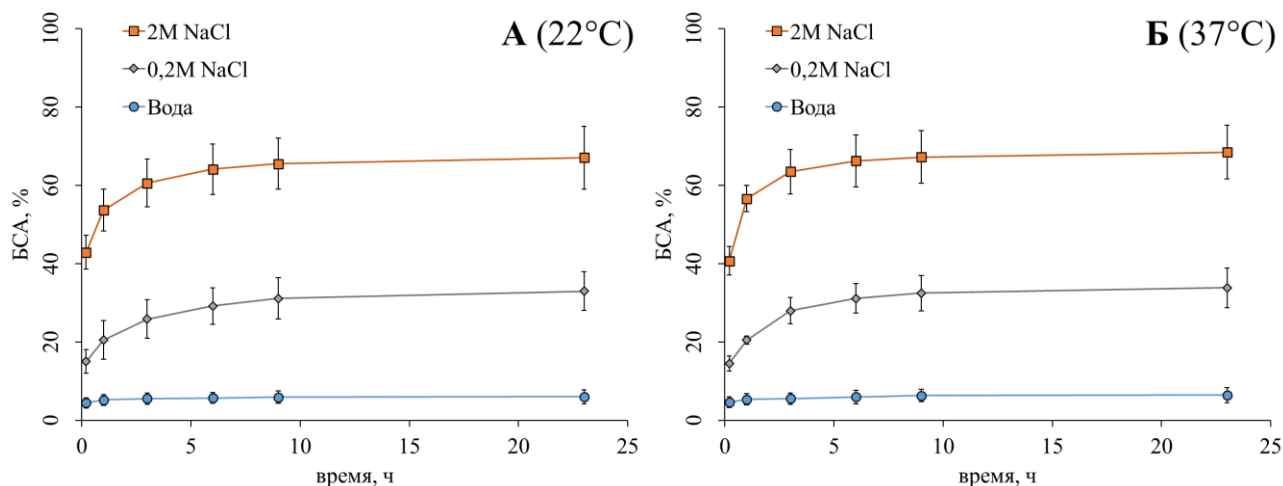


Рисунок 5. Зависимость высвобождения БСА в супернатанте от времени инкубации полиэлектролитных микрокапсул, полученных на сферолите CaCO_3 в присутствии солей, при 22° С (А) и при 37°С (Б)

Изучение организации полиэлектролитных слоев

Полиэлектролитные микрокапсулы, полученные на разных носителях, имеют конструктивные отличия, такие как наличие выраженной внешней оболочки, что приводит к различной скорости разрушения и скорости высвобождения вещества из них. Для понимания механизмов взаимодействия между инкапсулированным объектом и полиэлектролитами, входящими в состав полиэлектролитной капсулы, а также для прогнозирования влияния на капсулу внешних условий среды, необходимо исследование организации полиэлектролитных слоев микрокапсул, полученных на разных носителях.

Для лучшего понимания полимерной организации микрокапсул первым этапом являлось исследование их поверхностного заряда по дзета потенциалу. Для этого изготавливались капсулы трёх типов – содержащие белок (полученные на составном сферолите CaCO_3 -белок), заполненные интерполиэлектролитным комплексом (полученные на сферолите CaCO_3) и капсулы с не удалённым CaCO_3 ядром, имеющие в качестве наружного слоя полианион ПСС или поликатион ПАА. Было обнаружено, что поверхностный заряд микрокапсул не зависит от заряда полимера, образующего внешний слой капсулы, во всех случаях, кроме капсул с не удалённым CaCO_3 ядром. Таким образом была выдвинута гипотеза о перемешивании слоев микрокапсул на последнем этапе приготовления, в момент разрушения внутреннего ядра.

Для проверки данной гипотезы был поставлен эксперимент, оценивающий выход из микрокапсул полиэлектролита разных слоев. Для этого были изготовлены микрокапсулы, содержащие ФИТЦ- ПАА 1м, 3м, 5м или 7м слоем. Так как десорбция полимера в раствор может происходить только с поверхности микрокапсул, количество вышедшего ФИТЦ-ПАА разных слоев, будет пропорционально его содержанию во

внешнем слое. Исследование проводилось в 2М NaCl при 22°C, т. к. выше было показано, что наибольший уровень выхода полиэлектролита происходит при данных условиях. Результаты приведены на рисунке 6, за 100% принят уровень отслаивания 7-го слоя соответствующего типа капсулы.

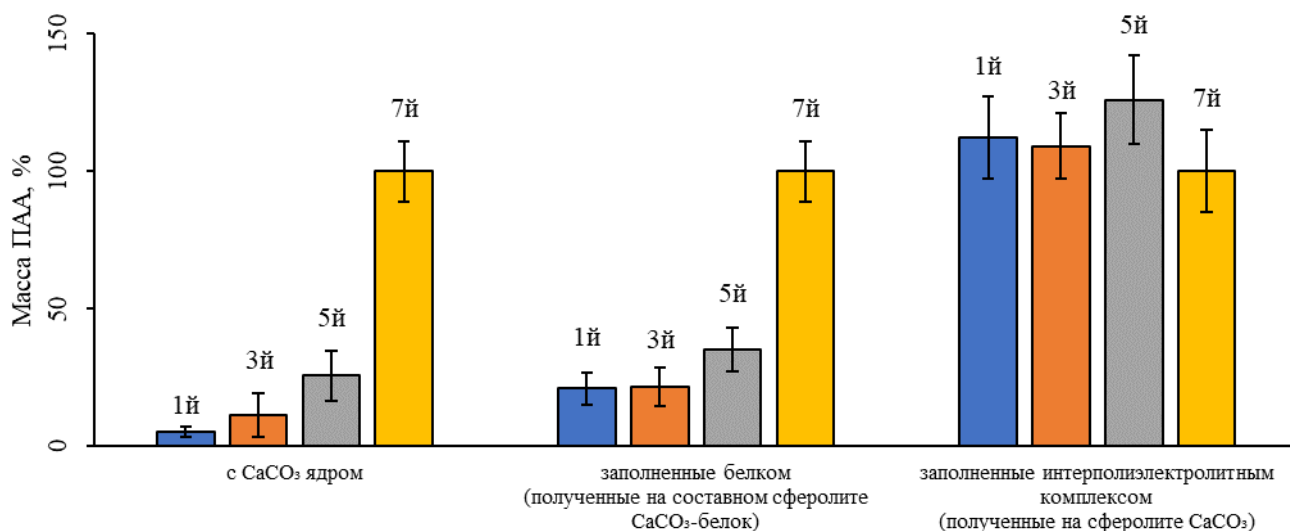


Рисунок 6. Выход полиэлектролита разных слоёв различных ПМК в 2М NaCl при 22°C

Как видно из рисунка, в случае микрокапсул с CaCO₃ ядром, перемешивание слоев не происходит и количество вышедшего ФИТЦ-ПАА зависит от глубины залегания слоя. У микрокапсул, заполненных белком, происходит частичное перемешивание полиэлектролитов, что может быть связано с тем, что содержащиеся белок микрокапсулы при 7 слоях имеют сформированную внешнюю оболочку, которая препятствует полному перемешиванию. Микрокапсулы, приготовленные на CaCO₃ сферолите, демонстрируют примерно равную степень присутствия всех слоев в растворе инкубации, что свидетельствует о том, что при разрушении ядра происходит перемешивание полиэлектролитных слоев. Полученные данные коррелируют с данными по изучению поверхностного заряда микрокапсул.

Буферные свойства полиэлектролитных микрокапсул

Буферная ёмкость наиболее характерна для слабых полиэлектролитов, она связана с их способностью к (де)протонированию и хорошо изучена. Благодаря этому свойству полиэлектролиты применяются для создания эффекта “протонной губки” (Benjaminsen et al., 2013), стимуляции высвобождения лекарственных средств (Moore et al., 2008), поддержания стабильного pH при культивации клеток (Matsumura et al., 1968) и стимуляции клеточной гибели (Gibney et al., 2012). Однако, растворы полиэлектролитов и полиэлектролиты в рамках супрамолекулярных систем могут иметь разные значения буферной ёмкости в разных диапазонах pH (Richard et al., 2013). Данные о влиянии полиэлектролитов входящих в состав супрамолекулярных структур

на буферную ёмкость можно использовать для защиты металлических поверхности от коррозии (Zheludkevich et al., 2007; Skorb et al., 2009; Andreeva et al., 2010), защиты органических молекул от рН-опосредованной деградации (Andreeva et al., 2017), это же свойство необходимо учитывать при создании рН-чувствительный датчиков и правильной интерпретации результатов их работы (Antipina et al., 2009; Kazakova et al., 2011; Abu-Thabit, 2018). Таким образом буферные свойства полиэлектролитных микрокапсул являются важной характеристикой при их применении для инкапсуляции рН-чувствительных соединений, создания буферного барьера, защищающего инкапсулируемое вещество (металлы, ферменты, полиэлектролиты, лекарственные препараты) и правильного предсказания влияния микрокапсул на рН среды.

Для выявления наличия буферной ёмкости микрокапсул, было проведено титрование $6,6 \times 10^9$ штук микрокапсул (ПСС/ПАА)₃ не содержащих белка в 8 мл воды, в диапазоне рН от 5 до 9 (рис. 7А).

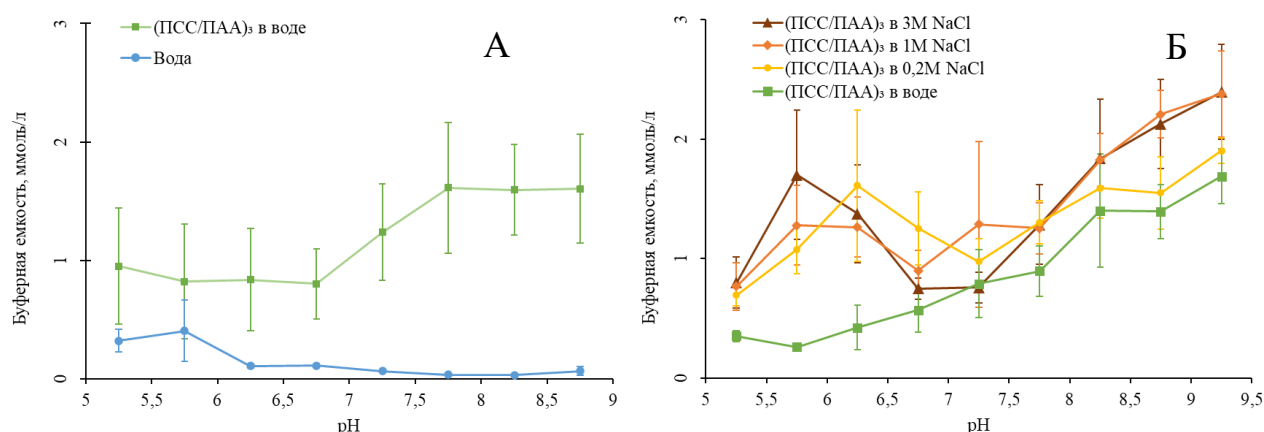


Рисунок 7. Буферная ёмкость суспензии $6,6 \times 10^9$ штук микрокапсул (ПСС/ПАА)₃ и воды (А), Буферная ёмкость ПМК состава (ПСС/ПАА)₃ в воде и 0,2 М, 1 М и 3 М NaCl (Б)

Была выдвинута гипотеза, что основной вклад в буферную ёмкость, вносят участки свободного ПАА, доступные для протонирования. Для подтверждения гипотезы было проведено исследование буферной ёмкости суспензии микрокапсул в присутствии 0.2, 2 и 3М NaCl, так как повышенная ионная сила приводит к разрыхлению микрокапсул и увеличению количества не скомпенсированных групп полимера (рис. 7Б).

Установлено, что буферная ёмкость суспензии микрокапсул, с повышением концентрации NaCl, увеличивается в щелочном диапазоне рН от 7,5 до 9, что подтверждает выдвинутую гипотезу. Значимость различий кривых титрования, в указанном диапазоне, между водой, 0,2М NaCl и 1М NaCl составляет $p < 0.01$ (критерий Мана-Уитни). С ростом концентрации соли от 1 до 3 М значения буферной ёмкости не

меняются, что может быть связано с отсутствием изменения количества несвязанного ПАА при увеличении концентрации соли больше 1М.

Далее было изучено влияния температуры на буферную ёмкость суспензии микрокапсул (рис. 8). Для этого микрокапсулы исследовались после 60 минутной инкубации при температурах 60 и 90°C. Показано, что при росте температуры прогрева микрокапсул, буферная ёмкость системы падает. Это объясняется тем, что при нагреве полиэлектролиты упорядочиваются и количество несвязанных между собой участков полиэлектролитов становится меньше.

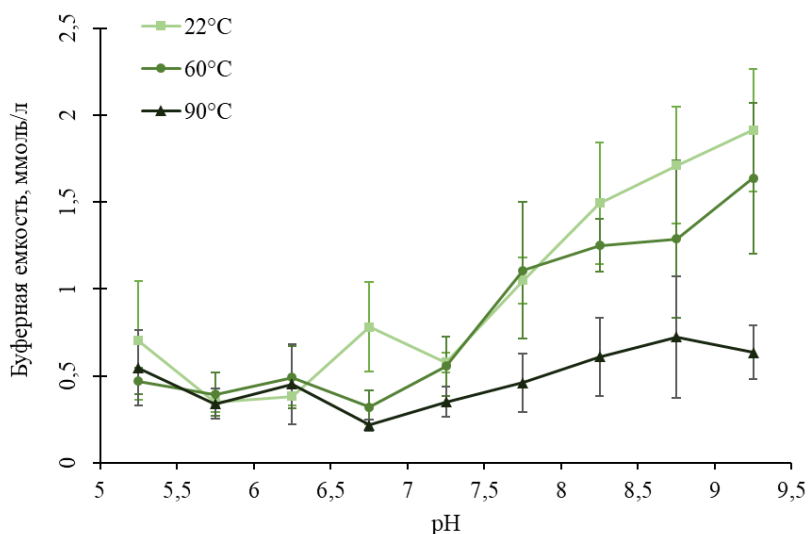


Рисунок 8. Буферная ёмкость суспензии $6,6 \times 10^9$ штук микрокапсул (ПСС/ПАА)₃, после их инкубации при 24°C, 60°C и 90°C

Для проверки взаимного влияния температуры и ионной силы среды, было проведено исследование буферной ёмкости ПМК, прогретых при 60 и 90°C, с последующим добавлением к ним 1М NaCl (рис. 9).

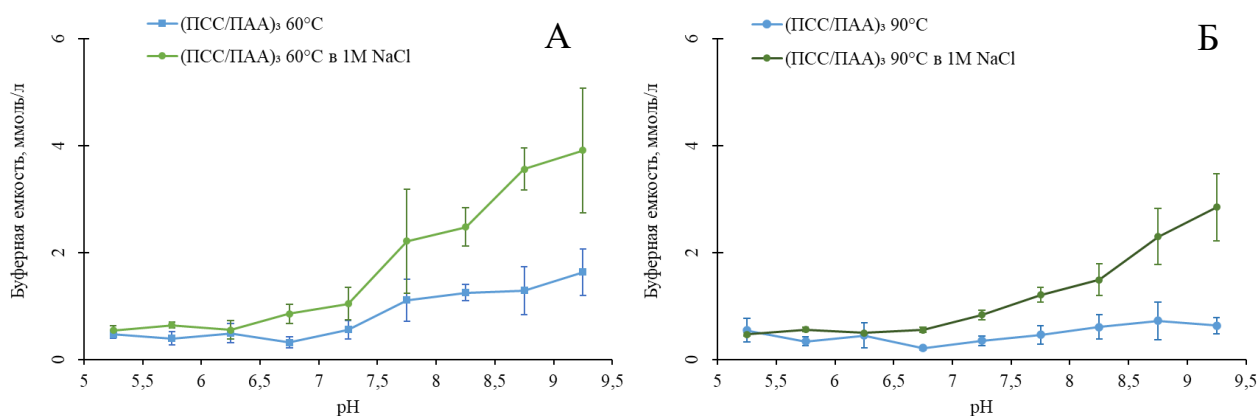


Рисунок 9. Буферная ёмкость суспензии $6,6 \times 10^9$ штук микрокапсул (ПСС/ПАА)₃ в воде и в растворе 1М NaCl после инкубации при 60°C (А) и 90°C (Б)

Показано, что добавление соли нивелирует эффект предварительного прогрева и буферная ёмкость системы возрастает. Таким образом прогрев и добавление соли можно рассматривать как противоположные процессы, приводящие в ПМК к уменьшению и увеличению количества свободных групп ПАА соответственно.

Следующим этапом работы стало изучение влияния количества ПМК на буферную ёмкость их суспензии. Количество полиэлектролитных микрокапсул может оказывать влияние на буферную ёмкость, так, в работе Киюн Тан и Алан Р. Дентон обнаружено, что изменение количества микрокапсул приводит к нелинейному сдвигу рН, который связан с нелинейным изменением плотности ионов внутри полостей ПМК (Tang, Denton, 2014). Кроме того, по мере увеличения объемной доли частиц возникает так называемый эффект “кластеризации” (Kanellopoulos et al., 2016). Увеличение количества частиц препятствует движению жидкости вокруг них, что приводит к более высокой вязкости системы (Mooney, 1951; Chong et al., 1971). В то же время скопившиеся частицы с разными эффективными объемами (разными размерами) могут привести к застою жидкости внутри частиц и между ними, что приводит к снижению текучести суспензии (Faroughi, Huber, 2014), в свою очередь, это может изменить локальную концентрацию $[H^+]$ и буферную ёмкость всей системы.

Для исследования влияния количества ПМК на буферную ёмкость использовались капсулы $(PSS/PAА)_3$ с титрами: $3,4 \times 10^9$ микрокапсул, $6,6 \times 10^9$ микрокапсул и $13,1 \times 10^9$ микрокапсул (рис. 10). В диапазоне рН от 5.5 до 9 показано пропорциональное увеличение буферной ёмкости от количества ПМК, что связано с увеличением количества ПАА в системе.

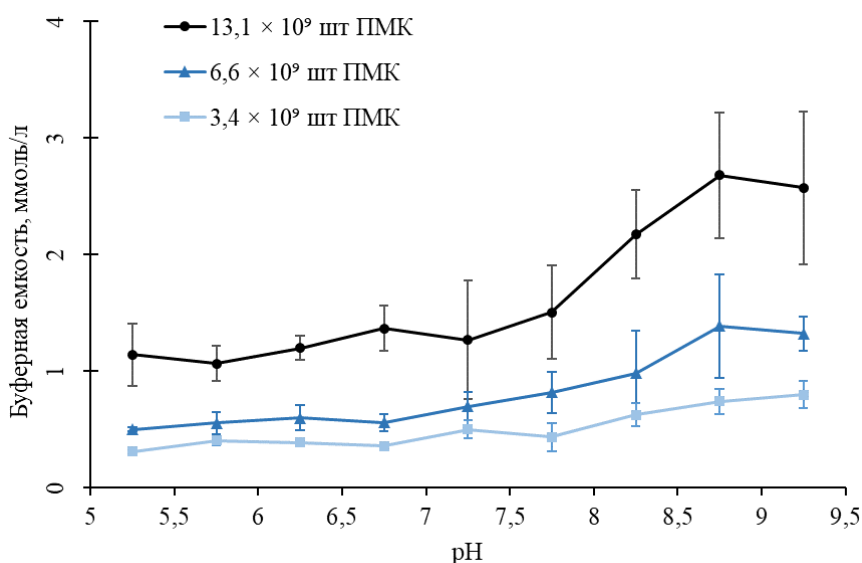


Рисунок 10. Буферная ёмкость суспензии $6,6 \times 10^9$ штук $(PSS/PAА)_3$ в зависимости от количества микрокапсул

Далее было изучено влияния количества слоев микрокапсул на буферную ёмкость. В работе Петрова с соавторами (Petrov et al., 2003), показано, что кинетика высвобождения ионов магния в раствор, из кристаллов покрытых полиэлектролитами, уменьшается с числом слоистых оболочек $n > 10$. Возможными факторами, контролирующими ионную проницаемость, являются плотность заряда полиэлектролитного комплекса, образующего оболочку ПМК, а также количество и размер его гидрофобных областей (Krasemann, Tieke, 2000; Krasemann, 2001; Qiu et al., 2001). Таким образом, увеличение количества слоев оболочки ПМК может снизить проницаемость для других ионов, например, H^+ и OH^- (Eneh et al., 2022), и, следовательно, изменить поведение буферной ёмкости ПМК при различном рН.

Для изучения влияния количества слоев микрокапсул на буферную ёмкость были исследованы капсулы состава $(PSS/PAA)_3$ и $(PSS/PAA)_3PSS$, результаты приведены на рисунке 11. Было установлено, что капсулы состава $(PSS/PAA)_3$ и $(PSS/PAA)_3PSS$ демонстрируют одинаковую буферную ёмкость на всем изучаемом диапазоне. Это может быть обусловлено тем, что за буферную ёмкость отвечает весь объем ПАА микрокапсулы, а не её поверхность.

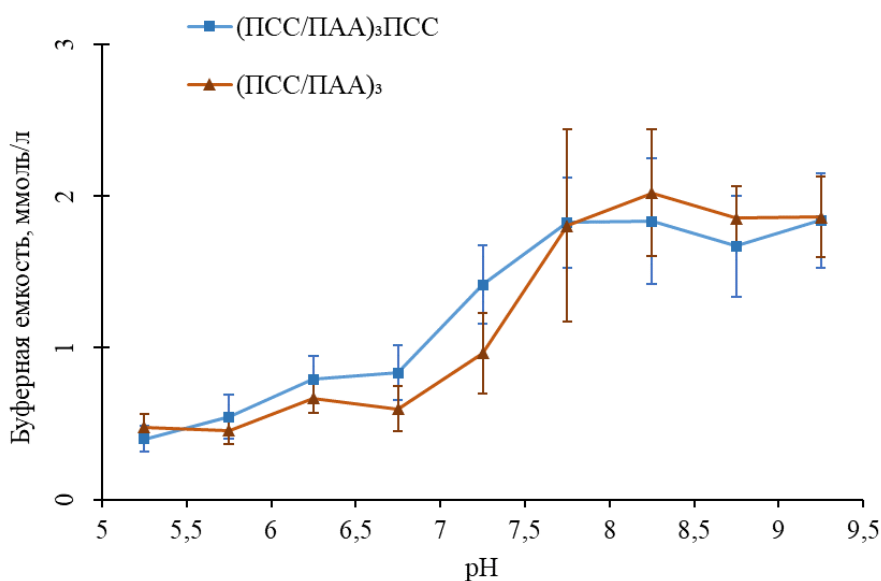


Рисунок 11. Буферная ёмкость суспензии $6,6 \times 10^9$ штук $(PSS/PAA)_3$ и $(PSS/PAA)_3PSS$

Для изучения буферной ёмкости микрокапсул, содержащих разное количество слоев ПАА, были измерены буферные ёмкости суспензий равного количества микрокапсул $(PSS/PAA)_3$ $(PSS/PAA)_5$ $(PSS/PAA)_7$ (рис. 12А). В ходе работы установлено, что с увеличением количества слоев оболочки ПМК, их буферная ёмкость также увеличивается, что подтверждает описанную выше гипотезу, однако, увеличение буферной ёмкости происходит не пропорционально количеству слоев полимера. Пересчёт вклада в буферную ёмкость на один слой, представлен на рисунке 12Б.

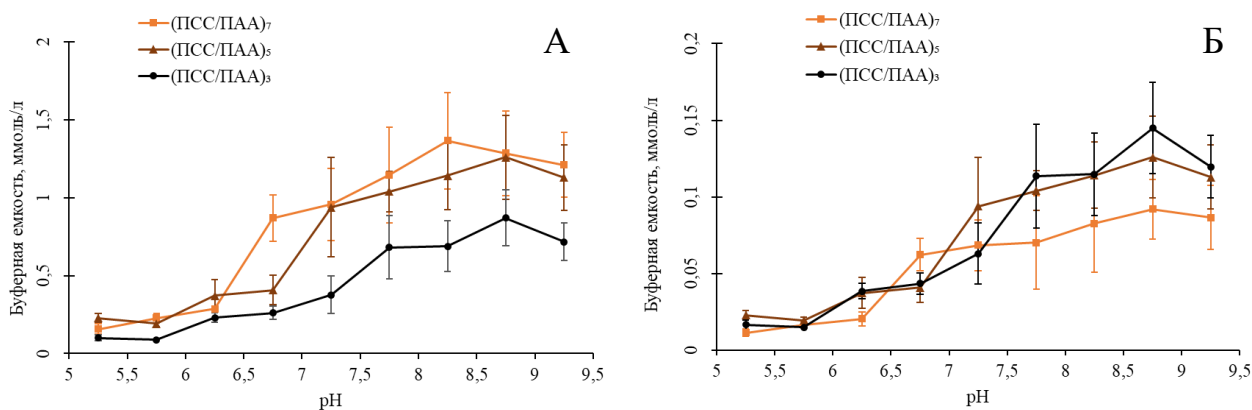


Рисунок 12. Буферная ёмкость $6,6 \times 10^9$ (ПСС/ПАА)₃ (ПСС/ПАА)₅ (ПСС/ПАА)₇ (А).
Буферная ёмкость ПМК, в пересчёте на 1 слой (Б)

Как видно из рисунка, с увеличением количества слоев, уменьшается вклад в буферную ёмкость одного слоя. Этот эффект может быть обусловлен несколькими причинами. Во-первых, на стадии приготовления ПМК количество адсорбированных полиэлектролитных слоев уменьшается с увеличением количества слоев (Estrela-Lopis et al., 2009), в результате уменьшается количество аминогрупп ПАА, доступных для (де)протонирования. Во-вторых, с увеличением количества слоев, из-за увеличения плотности заряда ПМК (уменьшается расстояние между ближайшими группами NH_3^+ групп) может уменьшаться проницаемость оболочки ПМК для протонов (Petrov et al., 2003; Eneh et al., 2022) и количество гидрофобных областей, в результате это приводит к уменьшению буферной ёмкости микрокапсулы, рассчитанной на 1 слой.

Разработка технологии декапсуляции веществ

Для применения микроконтейнера важным является разработка способа декапсуляции веществ из них. В настоящее время существует множество систем разрушения ПМК, в частности под действием ультрафиолета (Katagiri et al., 2009), ультразвука (Anandhakumar et al., 2012) и магнитного поля (Zheng et al., 2014). Особый интерес представляют системы запрограммированного вскрытия, не требующие применения дополнительного оборудования и способные разрушить ПМК в ответ на определенные условия среды. К ним относятся микрокапсулы высвобождающие вещество в ответ на содержание глюкозы (Bruno G. De Geest et al., 2006), окислительно-восстановительного потенциала (Zelikin et al., 2006) присутствие специфических ферментов (B. G. De Geest et al., 2006). Однако поиск новых способов высвобождения вещества, расширяющих возможности применения полиэлектролитных микрокапсул, остается одним из основных векторов развития микрокапсулирования.

В работе изучен новый подход к декапсуляции веществ – разрушение ПМК при прорастании инкапсулированных спор бактерий *B.subtilis*, при попадании их в благоприятную среду. Бактерии *B.subtilis* не являются патогенными и входят в состав кишечной микрофлоры человека, и по этой причине их споры подходят для разрушения полиэлектролитных микрокапсул в пищеварительной системе.

Были созданы микрокапсулы, состава (ПСС/ПАА)₃, загруженные бактериальными спорами методом копреципитации. Для лучшей визуализации объекта, в качестве внешнего полиэлектролитного слоя использовался ФИТЦ-ПАА. Капсулы представляли собой частицы диаметром 8 ± 1 мкм, правильной круглой формы с чётко выраженной недеформированной оболочкой (рис. 13).

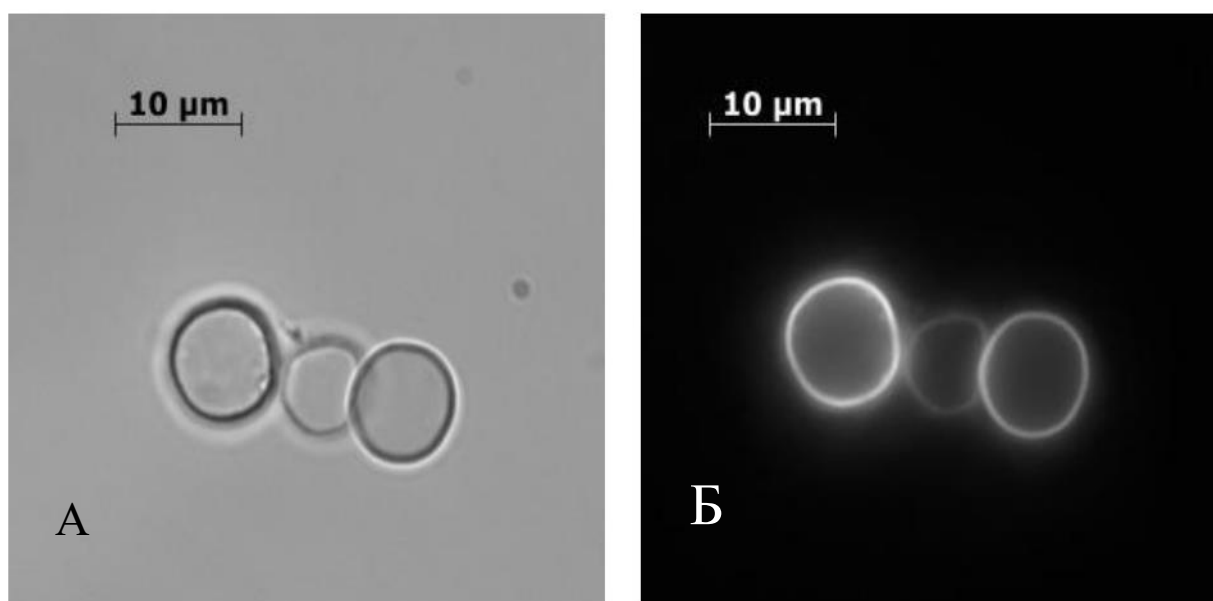
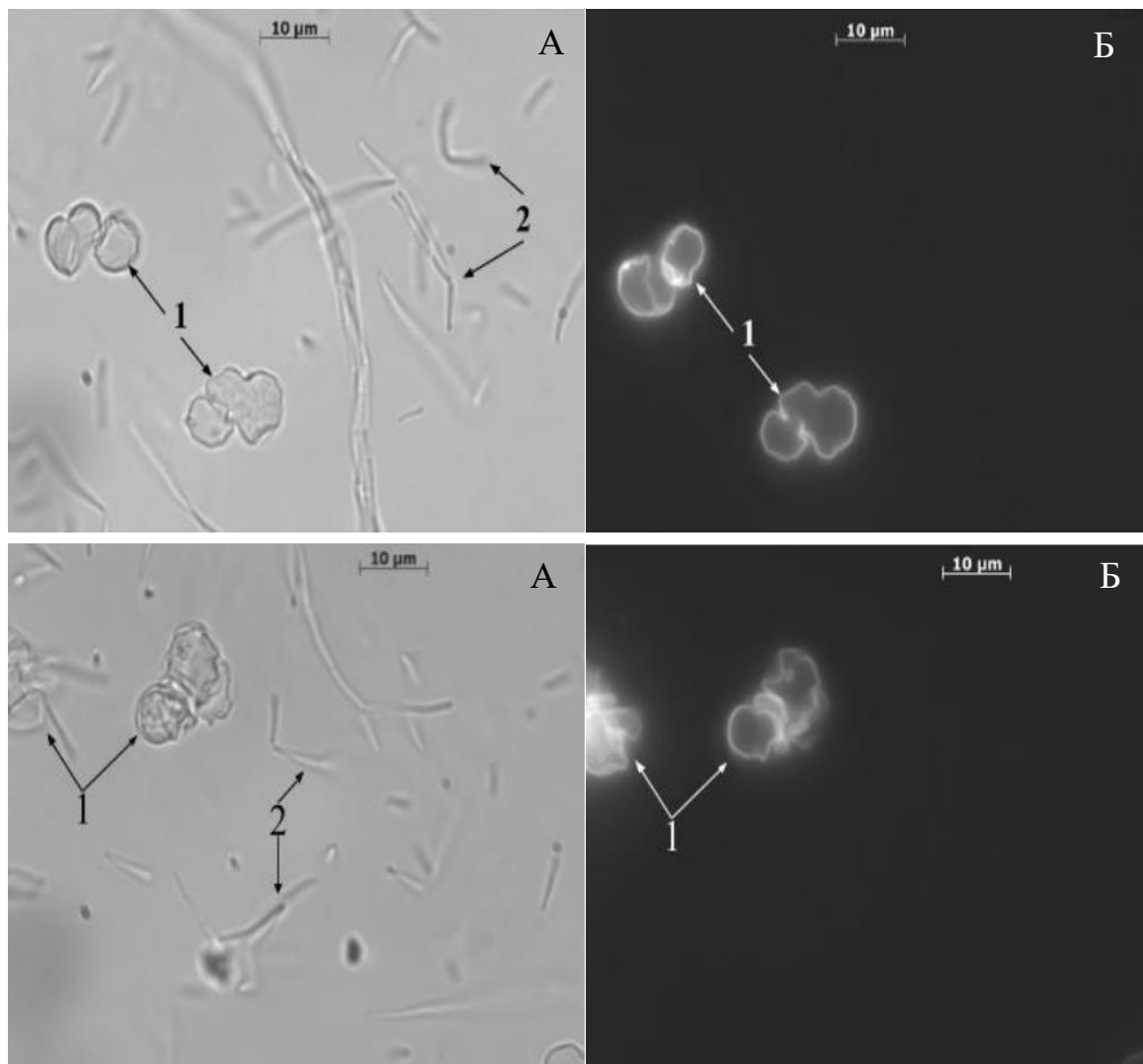


Рисунок 13. Полиэлектролитные микрокапсулы, содержащие споры *B. subtilis*, в питательной среде перед инкубацией. (А) оптическая микроскопия, (Б) флуоресцентная микроскопия

При добавлении суспензии микрокапсул со спорами в жидкую питательную среду, через 24 часа наблюдался бактериальный рост в виде однородного помутнения. С помощью оптической микроскопии (рис. 14), было констатировано разрушение 60% микрокапсул, при этом размер целых микрокапсул составляет около 2–3 мкм, а размер разрушенных микрокапсул составляет 5–7 мкм. Бактериального роста и разрушения микрокапсул при их инкубации в воде, зафиксировано не было. Таким образом установлено, что споры *B.subtilis* могут быть инкапсулированы в микрокапсулы с сохранением способности прорасти при попадании в питательную среду, благодаря полупроницаемости оболочки ПМК, способной пропускать питательные вещества внутрь капсулы.



*Рисунок 14. ПМК со спорами через 24 ч инкубации в питательной среде.
 А- оптическая микроскопия, Б- флуоресцентная микроскопия.
 1-разрушенные микрокапсулы, 2-бактерии*

Далее был проведён эксперимент по декапсуляции веществ, включённых в капсулу вместе со спорами. Для этого в ПМК, совместно со спорами был инкапсулировано ФИТЦ-декстран, найденный в среде после прорастания бактерий.

На основании вышеизложенного, микрокапсулы содержащие бактериальные споры представляют собой микроконтейнер, способный к разрушению при попадании в заданные условия среды и высвобождению содержащихся веществ. Технологическая схема получения таких микроконтейнеров представлена на рисунке 15.

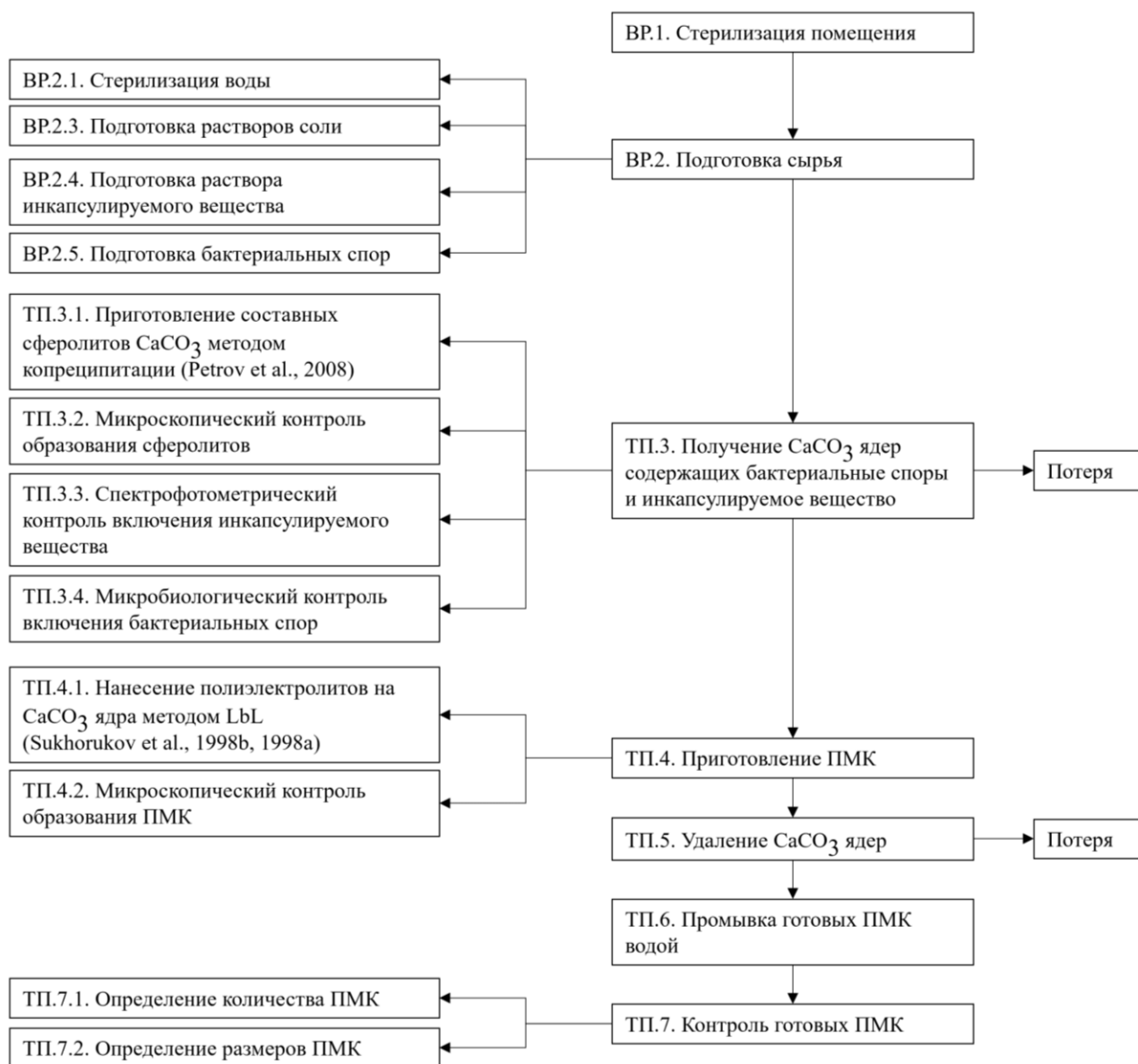


Рисунок 15. Приготовление микроконтейнеров на основе ПМК с бактериальной системой декапсуляции

Основное преимущество данной технологии вскрытия микрокапсул состоит в том, что он не требует использования дополнительного оборудования, такого как ультразвуковые или лазерные генераторы, при этом разрушение капсул происходит автоматически, в ответ на внешние условия. Учитывая использование в медицине и ветеринарии *B.subtilis* в качестве пробиотической культуры с антибактериальным и противогрибковым действием, результаты могут стать практической основой для создания новой формы лекарственного средства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе исследовались организация полиэлектролитных слоев и физико-химических свойств полиэлектролитных микрокапсул (ПМК), состоящих из полиэлектролитов полистиролсульфонат (ПСС) и полиаллиламин (ПАА), а также разрабатывалась технология разрушения капсул и декапсуляции веществ, для создания микроконтейнеров на их основе.

При оценке стабильности микрокапсул, полученных как на сферолите CaCO_3 , так и на составном сферолите CaCO_3 -белок, показано увеличение уровня отслаивания полиэлектролита с повышением концентрации соли в растворе. При сравнении солей хлорида натрия и сульфат аммония установлено, что на уровень десорбции влияет ионная сила раствора, а не конкурентное взаимодействие ионов соли с группами полиэлектролитов. У микрокапсул, полученных на составном сферолите CaCO_3 -белок уровень десорбции полимера, снижается, при повышении температуры до физиологической 37°C , что связано с уплотнением и утолщением оболочки микрокапсулы при нагревании. Оболочка так же препятствует высвобождению вещества, так, из капсул этого типа выход белка не превышал 0,3% от его содержания.

В случае микрокапсул, полученных на сферолите CaCO_3 , температура не влияет на скорость разрушения и выход белка, что может быть объяснено отсутствием у таких микрокапсул сформированной оболочки. Белок в такие микрокапсулы инкапсулируется методом сорбции и удерживается электростатическим взаимодействием, в связи с этим, его высвобождение зависит от ионной силы раствора.

При изучении организации полиэлектролитных слоев микрокапсул показано, что при наличии внутри капсулы CaCO_3 ядра, полиэлектролитные слои упорядочены и поверхностный заряд микрокапсулы соответствует заряду внешнего полиэлектролитного слоя. При растворении CaCO_3 ядра происходит перемешивание полиэлектролитных слоёв, и эта зависимость исчезает. При этом, у капсул, полученных на составном сферолите CaCO_3 -белок, из-за наличия оболочки перемешивание менее выражено, чем у капсул, полученных на составном сферолите CaCO_3 .

В ходе работы обнаружена и изучена буферная ёмкость микрокапсул. Выдвинута и подтверждена гипотеза о том, что за буферные свойства ПМК ответственны свободные группы ПАА. Показано, что при увеличении ионной силы раствора происходит увеличение буферной ёмкости, что связано с экранированием полиэлектролитов ионами соли и, как следствие, разрыхлением микрокапсул и увеличением количества свободных групп ПАА. При предварительном прогреве микрокапсул происходит уменьшение количества свободных групп ПАА и снижение буферной ёмкости ПМК, однако, добавление соли противонаправлено этому процессу и восстанавливает буферную ёмкость системы. Увеличение количества микрокапсул в

исследуемой суспензии пропорционально увеличивает буферную ёмкость. При увеличении количества слоев микрокапсул вклад в буферную ёмкость каждого следующего слоя снижается. Этот эффект может быть обусловлен уменьшением количества полимера в каждом следующем слое и снижением проницаемости оболочки ПМК для протонов.

Для высвобождения вещества из микрокапсул разработана новая система декапсуляции с использованием инкапсулированных спор *B.subtilis*. В ходе работы показано, что система активируется при попадании ПМК в условия благоприятные для роста бактерий и в течение 24 часов капсулы разрушаются с высвобождением инкапсулированного вещества.

Полученные результаты могут быть использованы при конструировании микроконтейнеров на основе полиэлектролитных микрокапсул для различных задач, а также предсказания их свойств и возможностей.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что десорбция полиэлектролита из ПМК возрастает с увеличением ионной силы среды. Повышение температуры до 37°C не влияет на стабильность микрокапсул, полученных на сферолите CaCO₃, но увеличивает стабильность микрокапсул, полученных на составном сферолите CaCO₃-белок.
2. Показано, что белок не выходит из микрокапсул, полученных на составном сферолите CaCO₃-белок. Из микрокапсул, полученных на сферолите CaCO₃, высвобождение белка, включённого методом сорбции, увеличивается с увеличением ионной силы.
3. Установлено, что при удалении CaCO₃ ядра, полиэлектролитные слои ПМК перемешиваются, у микрокапсул, полученных на составном сферолите CaCO₃-белок перемешивание происходит менее выражено. Вследствие перемешивания полиэлектролитных слоев нарушается соответствие поверхностного заряда микрокапсул с зарядом их внешнего слоя.
4. Выявлена собственная буферная ёмкость полиэлектролитных микрокапсул. Увеличение буферной ёмкость происходит с ростом концентрации соли, но снижается при повышении температуры, что связано с увеличением или уменьшением количества свободных участков ПАА соответственно.
5. Разработана технология декапсуляции вещества и разрушения микрокапсул, с использованием инкапсулированных спор *B.subtilis*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Scopus, WoS и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова:

1. Dubrovskii A.V., Kochetkova O.Y., Kim A.L., **Musin E.V.**, Seraya O.Y., Tikhonenko S.A. Destruction of shells and release of a protein from microcapsules consisting of non-biodegradable polyelectrolytes // International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials. – 2019. – Vol. 68. – № 4. – P. 160-164 (**WOS IF 2,604; SJR IF 0,435; Q2 (0,3/0,2)**) (Здесь и далее в скобках приведён объем публикаций в печатных листах и вклад автора в печатных листах).
2. **Musin E.V.**, Kim A.L., Dubrovskii A.V., Kudryashova E.B., Tikhonenko S.A. Decapsulation of dextran by destruction of polyelectrolyte microcapsule nanoscale shell by *Bacillus subtilis* bacteria // Nanomaterials. – 2019. – Vol. 10. – № 1. – P. 12 (**WOS IF 5,076; SJR IF 0,919; Q1 (0,5/0,35)**).
3. **Musin E.V.**, Kim A.L., Tikhonenko S.A. Destruction of polyelectrolyte microcapsules formed on CaCO₃ microparticles and the release of a protein included by the adsorption method // Polymers. – 2020. – Vol. 12. – № 3. – P. 520 (**WOS IF 4, 967; SJR IF 0,72; Q1 (0,5/0,4)**).
4. **Musin E.V.**, Kim A.L., Dubrovskii A.V., Tikhonenko S.A. New sight at the organization of layers of multilayer polyelectrolyte microcapsules // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 14040 (**WOS IF 4,379; SJR IF 1,24; Q1 (0,45/0,3)**).
5. Kim A.L., **Musin E.V.**, Ramazanov B.R., Tikhonenko S.A. The discovery of the buffer capacity of various types of polyelectrolyte microcapsules // Polymers. – 2021. – Vol. 13. – № 22. – P. 4026 (**WOS IF 4, 967; SJR IF 0.72; Q1 (0,5/0,3)**).
6. Dubrovskii A.V., Kim A.L., **Musin E.V.**, Tikhonenko S.A. A study of the buffer capacity of polyelectrolyte microcapsules depending on their ionic environment and incubation temperature // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – № 12. – P. 660 (**WOS IF 5,923; SJR IF 1,455; Q1 (0,5/0,3)**).
7. **Musin E.V.**, Dubrovskii A.V., Kim A.L., Tikhonenko S.A. Study of the buffer capacity of polyelectrolyte microcapsules depending on their concentration and the number of layers of the polyelectrolyte shell // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – № 17. – P. 9917 (**WOS IF 5,923; SJR IF 1,455; Q1 (0,5/0,4)**).