

Московский государственный университет
имени М.В.Ломоносова
Биологический факультет
Институт теоретической и экспериментальной биофизики
Российской академии наук

На правах рукописи



Мусин Егор Валиевич

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

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Тихоненко Сергей Алексеевич

Москва - 2023

Оглавление

1. Введение.....	3
2. Список сокращений	11
3. Литературный обзор	12
3.1. Микроконтейнеры.....	12
3.1.1. Микроконтейнеры в медицине	13
3.1.2. Микроконтейнеры в биотехнологии	15
3.1.3. Микроконтейнеры в прочих областях	17
3.2. Полимерные микроконтейнеры.....	18
3.3. Полиэлектrolитные микрокапсулы	21
3.3.1. Влияние ядра на структуру полиэлектролитных микрокапсул	22
3.3.2. Свойства полиэлектролитной оболочки	24
3.3.3. Влияние факторов среды на полиэлектролитные капсулы	27
3.3.4 Декапсуляция веществ из полиэлектролитных микрокапсул	30
3.3.5 Применение полиэлектролитных микрокапсул в качестве микроконтейнеров.....	42
4. Материалы и методы	52
5. Результаты и обсуждение.....	57
5.1. Стабильность полиэлектролитных микрокапсул	57
5.1.1. Стабильность микрокапсул, полученных на составном сферолите CaCO ₃ -белок	60
5.1.2. Стабильность микрокапсул, полученных на CaCO ₃ сферолите	62
5.2. Динамика высвобождения инкапсулированного белка	64
5.2.1. Динамика высвобождения инкапсулированного белка из микрокапсул, полученных составном сферолите CaCO ₃ -белок.....	64
5.2.2. Динамика высвобождения инкапсулированного белка из микрокапсул, полученных CaCO ₃ сферолите.....	65

5.3. Изучение организации полиэлектролитных слоев	67
5.4. Буферные свойства полиэлектролитных микрокапсул.....	71
5.4.1. Влияние температуры на буферную ёмкость микрокапсул	74
5.4.2. Влияние количества микрокапсул и полиэлектролитных слоев на буферную ёмкость.....	76
5.5. Разработка технологии декапсуляции веществ	80
6. Заключение	85
7. Выводы.....	87
8. Список литературы	88

1. Введение

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 and 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., 2007a), 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 емкость среды, в частности, буферные свойства микрокапсул не учитываются при создании рН 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 рН-опосредованной деградации (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 емкость 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 емкость 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 емкость 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 емкость 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 (Alexei A 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 сорбции (Kochetkova et al., 2013). Оценка количества отслоившегося полиэлектролита и высвободившегося вещества производилась методом флуоресцентной спектроскопии. Заряд микрокапсул определялся с помощью прибора Zetasizer nano ZS (УК). Для оценки влияния ПМК на буферную емкость среды, титрование проводилось путём ручного измерения с помощью рН-метра Hanna рН 211, с последующим расчётом буферной емкости 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 нерастворенным 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.

2. Список сокращений

ЛП	– лекарственные препараты
ПМК	– полиэлектролитные микрокапсулы
ПЛиз	– полилизин
ПАрг	– полиаргенин
ДС	– декстрансульфат
ПАА	– полиаллиламин
ПСС	– полистиролсульфонат
ПДАДМА	– полидиаллилдиметиламмоний
ФИТЦ	– флуоресцеинизотиоционат
БСА	– бычий сывороточный альбумин
ЭДТА	– этилендиаминтетраацетат
ПЭГ	– полиэтиленгликоль

3. Литературный обзор

3.1. Микроконтейнеры

Микрокапсулирование – это современный технологический процесс, который широко используется в различных промышленных и научных областях. Сущность микрокапсулирования заключается в «упаковке» требуемого вещества внутрь стабильной оболочки – контейнера, способного удерживать ядро, наполнитель или внутреннюю фазу. По размеру такие контейнеры можно подразделять на нанокапсулы (10–1000 нм), микрокапсулы (1–1000 мкм) и миликапсулы (размером более 1 мм) (Trojanowska et al., 2017). Для формирования микрокапсул используются различные методы, в том числе: распылительная сушка, экструзионное покрытие, покрытие в псевдооживленном слое, коацервация, послойное нанесение и метод межфазной полимеризации (Ghosh, 2006; Trojanowska et al., 2017). Бурное развитие различных технологий микрокапсулирования объясняется возможностью комбинировать свойства различных объектов и материалов в одном изделии.

Основным предназначением микроконтейнеров традиционно представляется защита инкапсулированного объекта от неблагоприятных условий окружающей среды, таких как нежелательное воздействие света, влаги и кислорода (Shahidi, Han, 1993). Однако, не менее важным свойством микрокапсул является увеличение возможностей контроля над инкапсулируемым веществом. В частности, микрокапсулы с модифицированной оболочкой могут обеспечить направленную доставку вещества в определенные клетки и органы пациента (Caruso et al., 1999); обеспечить контролируемое высвобождение инкапсулированного объекта (Carregal-Romero et al., 2015); обеспечить возможность извлечения веществ из реакционной среды или анализируемой жидкости (Tikhonenko et al., 2021).

Большой потенциал микрокапсул также раскрывается при использовании их в незаполненном виде, в частности «Пустые» микрокапсулы могут быть применены в качестве фильтров и сорбентов (Vorji et al., 2020; Kim et al., 2023), и как самодостаточная система анализа и диагностики (Dubrovskii et al., 2019; Kim et al., 2022).

3.1.1. Микроконтейнеры в медицине

Множество исследований последних лет сконцентрировано на медицинском применении микроконтейнеров. Технология микрокапсулирования широко используется в фармацевтической промышленности для контролируемого высвобождения лекарственных средств, повышения стабильности и маскировки вкуса лекарственных препаратов (Mendanha et al., 2009; Jańczyk et al., 2010). Наиболее важным направлением применения микроконтейнеров в медицине является создание систем адресной доставки лекарственных препаратов (ЛП). Использование микроконтейнеров в медицине делает возможным применение гидрофобных ЛП без использования солюбилизаторов (Allen, Cullis, 2004), за счёт высокой массы систем увеличивается время циркуляции действующего вещества в крови, также такие системы могут быть пассивно направлены на опухолевые клетки, что приводит к повышенной концентрации препаратов в целевых тканях и, как следствие, к снижению общей токсичности терапии (Allen, Cullis, 2004; Nichols, Bae, 2014), (Lammers et al., 2008; Oerlemans et al., 2010). Такие системы увеличивают накопления ЛП в целевом участке; снижают их присутствие в здоровых тканях; защищают вещества от преждевременной деградации; ускоряют поступления ЛП в клетки (Дмитриева и др., 2012). Современные микроконтейнеры для адресной доставки ЛП весьма разнообразны (Jain, 2020) и включают фуллерены (Zakharian et al., 2005) и углеродные трубки (Son et al., 2007), микрокапсулы из нейлона (Chang, 1976) и человеческого альбумина (Longo, Goldberg, 1985), фармакоциты, полученные на основе клеток человека и животных

(Бегдуллаев и др., 2008; Цой и др., 2012), дендримеры (Cheng et al., 2008), ниосомы (Ge et al., 2019) и структуры на основе ДНК-оригами (Andersen et al., 2009), однако, наиболее распространёнными из них являются липосомы (Барсуков, 1998; Sercombe et al., 2015) и полимерные микрокапсулы (Sukhorukov et al., 2007; Ariga et al., 2011).

В настоящий момент липосомы являются одним из наиболее изученных методов адресной доставки, на их основе создан ряд зарегистрированных препаратов (Sercombe et al., 2015). Липосомы представляют собой капсулы, состоящие из одного или нескольких концентрических липидных бислоёв и вмещающих дискретные водные пространства (Sercombe et al., 2015). Простые липосомы состоят из незаряженных и/или отрицательно заряженных фосфолипидов и/или холестерина. Введённые в организм они циркулируют в кровотоке в течение довольно короткого периода времени и быстро накапливаются в макрофагах, в печени и селезёнке (Davidson et al., 1994; Moghimi et al., 2001). Это свойство липосом используется для доставки в макрофаги иммуномодуляторов, цитотоксических и противомикробных соединений. Например, активирующие факторы (цитокины), доставленные в макрофаги, таким образом, наделяют их способностью к обнаружению опухолевых клеток (Immordino et al., 2006). Применение стерически стабилизированных липосом, имеющих на своей поверхности дополнительное покрытие в виде полиэтиленгликоля (ПЭГ), приводит к повышению терапевтической эффективности терапии и уменьшению побочных эффектов по сравнению с обычными препаратами (Moghimi et al., 2001). Катионные липосомы, созданные из модифицированных липидов, содержащих в своём составе положительно заряженную группу, применяют для доставки генетического материала в клетку (Ropert, 1999).

Полимерные микрокапсулы представляют собой альтернативную липосомам систему доставки. Технология доставки с использованием полимерных капсул охватывает те же области применения, что и липосомы,

при этом, благодаря составной структуре, капсулы имеют возможность более гибкой “настройки” в соответствии с поставленной задачей (Ariga et al., 2011). Бородиной с соавторами (Бородина и др., 2007) на примере химотрипсина показана возможность применения биodeградируемых капсул на основе альгината натрия и поли-L-лизина, в частности продемонстрировано практически полное сохранение активности фермента после его высвобождения, что делает разработку перспективной для применения в лечении тромбозов (Бородина и др., 2007). На основе полимерных микрокапсул из этилакрилата, метилметакрилата и 2-гидроксиэтилметакрилата, создана система пролонгированного высвобождения и адресной доставки водорастворимого пептидного лекарственного средства в толстую кишку человека (Arimoto et al., 2004). На основе гепарина и хитозана созданы микроконтейнеры для инкапсуляции доксорубицина (Chen et al., 2014). Такие микрокапсулы устраняют побочные эффекты токсичного доксорубицина и защищают гепарин от преждевременной деградации, таким образом, в клетки попадает сразу оба действующих вещества. Синергетический эффект гепарина и доксорубицина в составе микроконтейнера был продемонстрирован на клетках карциномы легких человека (A549)(Chen et al., 2014).

3.1.2. Микроконтейнеры в биотехнологии

Большое количество работ направлено на применение микрокапсул в пищевой промышленности (Shahidi, Han, 1993; Desai, Jin Park, 2005; Trojanowska et al., 2017; Cui et al., 2023; Sobel et al., 2023). В продуктах питания микроконтейнеры применяются по целому ряду причин, включая: защиту инкапсулированного вещества от разложения и снижение скорости его испарения; изменение физических характеристик исходного материала для облегчения его обработки; регулирование высвобождения веществ; для маскировки нежелательного аромата или привкуса; для разделения компонентов смеси, которые могут вступить в реакцию друг с другом (Desai,

Jin Park, 2005; Trojanowska et al., 2017). Отдельное внимание уделяется возможностям применения микроконтейнеров для микроорганизмов с целью создания пробиотиков (Heidebach et al., 2012; Das et al., 2014; Xie et al., 2023). Известно, что жизнеспособность пробиотиков может значительно снижаться во время хранения продуктов питания и прохождения через желудочно-кишечный тракт, что препятствует реализации их пользы для здоровья. Методы микрокапсулирования пробиотических культур для молочных продуктов, мясных изделий, немолочных напитков и хлебобулочных изделий, признаны эффективным способом повышения стабильности пробиотиков при обработке и хранении пищи. Дополнительно, микроконтейнеры обеспечивают их локализацию и медленное высвобождение в кишечнике (Heidebach et al., 2012; Das et al., 2014; Xie et al., 2023).

Микроконтейнеры находят применения в качестве носителей инсектицидов и активно применяются в сельском хозяйстве. Для обработки посевов применяют микроконтейнеры на основе синтетических сополимеров, загруженные пестицидами (Вальтер Хэсслин, 1999; Tanaka, Ueda, 2013). Такой подход обеспечивает закрепление инсектицида на растениях и его защиту от действия ультрафиолета. Аналогичным образом для борьбы с саранчой запатентовано применение пористых микрокапсул из полимочевины, несущих споры энтомопатогенных грибов рода *Beauveria* (Серегин, 2016). Микроконтейнеры могут быть загружены смесью различных микроорганизмов, в частности, в качестве средства против вредителей сельского хозяйства применяются микрокапсулы загруженные *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana* и *Streptomyces spp* (Комаров, 2021).

Современные технологии микрокапсулирования находят своё применение в очистке сточных и грунтовых вод (Rathore et al., 2013; Ethica, 2020). Одним из способов применения микрокапсул в этой области является инкапсуляция бактериальных клеток для биоремедиации. Такой подход позволяет защитить микроорганизмы от инфекций бактериофагами и абиотических стрессов, таких как колебания температуры и pH (Rathore et al.,

2013). Так, на основе полимерных микрокапсул из сульфат целлюлозы натрия и хлорид полидиметилдиаллиламмония были созданы микроконтейнеры для инкапсуляции *Chlorella sp.* Благодаря этим микроконтейнерам удалось увеличить количество удаляемых из сточных вод азота и фосфатов (Zeng et al., 2012). Другим подходом является стимуляция роста полезных бактерий по средствам пролонгированного высвобождения питательных веществ из микрокапсул (Reis et al., 2018). Так в работе (Reis et al., 2013) были изготовлены микроконтейнеры из карбоксиметилцеллюлозы с возможностью длительного высвобождения азота, фосфора и калия. Их применение вызывало биостимуляцию и увеличило эффективность биодegradации нефти в воде (Reis et al., 2013).

3.1.3. Микроконтейнеры в прочих областях

Спектр областей применения технологии микрокапсулирования чрезвычайно разнообразен и выходит далеко за пределы медицины и биотехнологии. Первая промышленная продукция с использованием микрокапсул, разработанная в 1950 г., представляла собой безуглеродную копировальную бумагу. Микрокапсулы для нее были получены коацервацией желатина и гуммиарабика и давали возможность инкапсуляции гидрофобных красителей (Fanger, 1974).

Микрокапсулы активно применяются в строительстве (Boh Podgornik, Šumiga, 2008). Так, среди прочего, микрокапсулы, на основе акриловой смолы, монооксида кремния и крахмала применяются для контроля гидратации цемента (Choi et al., 2016). Запатентовано применение микрокапсул, содержащих воду, для увеличения огнестойкости гипсокартонных плит, красок или теплоизоляционных материалов (Parthy, 2003; Adachi, 2005). В патенте, выданном Хигашизака (Higashizaka, 2002a, 2002b, 2004), микрокапсулы, с возможностью пролонгированного высвобождения, содержащие хинокитиол, применялись для защиты зданий от

плесени, бактерий и насекомых, а также для достижения дезодорирующего эффекта.

В последние годы множество типов микроконтейнеров нашло свое применение в текстильной промышленности (Nelson, 2001; Kumari, 2022; Peng et al., 2023). Целью применения микрокапсул обычно является длительное сохранение качества и прочности ткани (Nelson, 2001), однако, микроконтейнеры открывают возможность и создания одежды с принципиально новыми свойствами. Наиболее наглядными примерами являются текстиль с длительной отдушкой, рубашки с термозаменяемыми цветами, военная форма с микрокапсулированными инсектицидами, автомобильные сиденья с терморегуляцией, лыжные куртки, перчатки и т.д. (Sarier, Onder, 2007; Valle et al., 2021).

Активно обсуждается применение микроконтейнеров в нефтегазовой отрасли (Замрий, Викторова, 2019), в частности полиэлектролитные микрокапсулы рассматриваются в качестве фильтра для очистки среды от серы, очистки сырой нефти от ванадия и молибдена и очистки воды от ионов металла, перед ее закачкой в скважины. Также рассматривается применение микрокапсул в качестве маркера потока при исследовании сообщающихся скважин.

3.2. Полимерные микроконтейнеры

Полимерные микроконтейнеры - это капсулы диаметром от нескольких нанометров до нескольких микрон, получаемые с помощью послойной самоорганизации молекул комплементарных полимеров на поверхности ядра (матрицы) (Sukhorukov et al., 2007). Полимерные капсулы можно классифицировать на группы, по типу связи между полимерами, входящими в их состав, на капсулы, основанные на молекулярном узнавании, ковалентных, водородных и электростатических связях.

Капсулы, основанные на ковалентных связях. Ковалентные связи являются одними из наиболее прочных, помимо конструирования капсул на их основе, ковалентный тип связи между полимерами используется для

дополнительной стабилизации капсул, полученных другими видами межмолекулярных взаимодействий. Такая стабилизация предотвращает преждевременную деградацию капсул в биологических средах. Конструирование капсул, основанных на ковалентных связях, позволяет варьировать функциональными группами и, благодаря этому, придавать капсулам способность деградировать при поглощении клетками-мишенями, а также дают возможность изготавливать оболочку капсул из двух различных комплементарных модификаций одного и того же полимера (Jia et al., 2011).

Впервые такой подход был предложен при последовательной обработке глутаральдегидом слоёв полимера, боковые цепи которого были модифицированы первичными аминами (Tong et al., 2005). Другой пример капсулы, полученной за счёт ковалентных связей в образующих их полимерных парах, был продемонстрирован на структуре полидихлорфосфазен/ гексаметилендиамин и полиглицидил-метакрилат/ полиаллиламин (ПАА)(Feng et al., 2009).

Благодаря высокой селективности ковалентных связей удается избежать нежелательного взаимодействия полимеров, входящих в состав капсулы, с молекулами инкапсулированных веществ. Главными недостатками применения таких связей при конструировании капсул являются отсутствие коммерчески доступных модифицированных полимеров и относительная технологическая сложность их изготовления.

Капсулы, основанные на водородных связях, состоят из полимеров, содержащих водород донор и атом акцептор. При приготовлении капсул используют полимеры: поли-N-винилпирролидон (ПВП), полиэтиленгликоль (ПЭГ), или поли-N-изопропилакриламид (ПИПАМ), а также поликислоты, например, полиметакриловую кислоту, у которой гидроксильные группы выступают в качестве доноров протона 1 (Such et al., 2011). Применение полимеров, закрепление которых обеспечивается водородными связями, позволяет отказаться от токсичных поликатионов и использовать недорогие природные соединения. Основной особенностью таких капсул является

возможность их разрушения при физиологических значениях pH (Such et al., 2011).

Капсулы, основанные на молекулярном узнавании. Принцип молекулярного узнавания (molecular recognition) в большей степени описывает взаимодействие и самосборку цепей нуклеиновых кислот, аминокислот и работу ферментов, однако, применим и в конструировании соответствующего типа капсул. Сборка на основе молекулярного узнавания происходит за счёт нековалентных взаимодействий типа «гость-хозяин». Молекула «хозяин» имеет участок избирательного связывания с другой молекулой — «гостем». Обе молекулы должны соответствовать друг другу структурно и энергетически – быть комплементарны друг другу (Лен, 1998).

В исследовании Ванг (Wang et al., 2008) стабильные капсулы были получены с помощью взаимодействия типа «гость-хозяин» между полиаллиламином, модифицированным группами β -циклодекстрина, с модификацией этого же полимера, содержащего ферроцен (Wang et al., 2008). В другом примере капсулы данного типа были созданы за счёт образования стереокомплекса между чередующимися слоями изотактического и синдиотактического полиметилметакрилата (Kida et al., 2006).

В настоящее время известно не так много примеров применения данного метода сборки капсул, так как он требует сложных в технологическом плане модификаций полимеров, однако несмотря на это, предсказуемое изменение проницаемости таких капсул в ответ на колебания pH и окислительно-восстановительного потенциала среды, а также высокая специфичность взаимодействия полимеров делает их изучение необходимым для дальнейшего развития наномедицины (Gunawan et al., 2014).

Капсулы, основанные на электростатических связях, состоят из полиэлектролитов - полимеров, макромолекулы которых содержат ионогенные функциональные группы, способные к электростатическому взаимодействию между собой. Впервые тип сборки, основанный на электростатическом взаимодействии, был применен при создании

полимерных мультислойных плёнок с помощью пары водорастворимых противоположно заряженных полимеров – полиаллиламин (ПАА) и полистиролсульфонат (ПСС)(Decher, Hong, 1991a; Decher et al., 1992). На основе этих же полимеров в дальнейшем были созданы “полимерные щетки”, способные удерживать активные ферменты (Decher et al., 1994), и полиэлектролитные микрокапсулы, загруженные белком (Caruso et al., 2000). Более подробно этот тип капсул рассматривается ниже.

3.3. Полиэлектролитные микрокапсулы

Полиэлектролитные микрокапсулы (ПМК), разработанные в 1991 году (Decher, Hong, 1991b) изготавливаются при поочередной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов на ядро – твердый носитель с его последующим удалением. Такая методика формирования полиэлектролитных оболочек получила название “layer-by-layer” (слой за слоем) (Sukhorukov et al., 1998b, 1998a). Весь процесс приготовления можно разделить на 3 этапа, схематично представленные на рисунке 1.

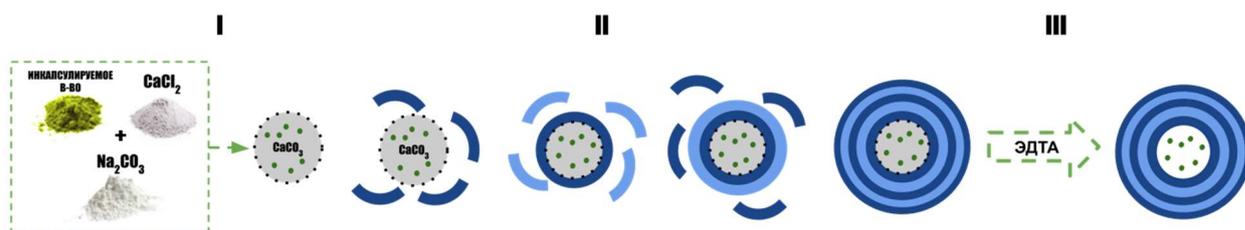


Рисунок 1. Схема этапов приготовления полиэлектролитных микрокапсул I-формирование ядра, II-Поочередное нанесение полиэлектролитов, III-Удаление ядра.

На первом этапе приготовления ПМК формируется ядро будущей микрокапсулы, которое может содержать инкапсулируемое вещество. На втором этапе ядра поочередно обрабатываются растворами противоположно заряженных полиэлектролитов, при этом происходит адсорбция полимера на ядро. Нанесение каждого последующего слоя полимера меняет поверхностный заряд будущей капсулы на противоположный, обеспечивая сцепление со следующим слоем. В результате нанесения полиэлектролитов на поверхности ядра формируется водонерастворимый комплекс

полианион/поликатион. На третьем этапе происходит разрушение внутренних ядер капсул, в случае CaCO_3 ядер, за счёт ЭДТА. Технология LbL позволяет получать капсулы с широким спектром коэффициентов проницаемости, которые могут быть адаптированы в зависимости от желаемого применения (Humblet-Hua et al., 2012).

Наибольшее влияние на структуру и свойства ПМК оказывают: применяемое при приготовлении ядро, полиэлектролиты, выбранные для формирования полиэлектролитной оболочки и параметры сред приготовления и хранения, такие как pH, ионная сила раствора и температура. Благодаря этому свойства полиэлектролитных капсул могут быть «настроены» путем правильного подбора компонентов и условий приготовления. Получаемые таким образом ПМК варьируются в размере от нескольких нанометров (Maуа et al., 2003) до десятков микрон (Shenoy et al., 2003).

3.3.1. Влияние ядра на структуру полиэлектролитных микрокапсул

По своей структуре полиэлектролитные микрокапсулы подразделяют на три типа: А полые, Б условно полые, заполненные интерполиэлектролитным комплексом, В загруженные белком (рис.2). Тип ПМК зависит в первую очередь от частицы, выбранной на начальном этапе в качестве ядра.

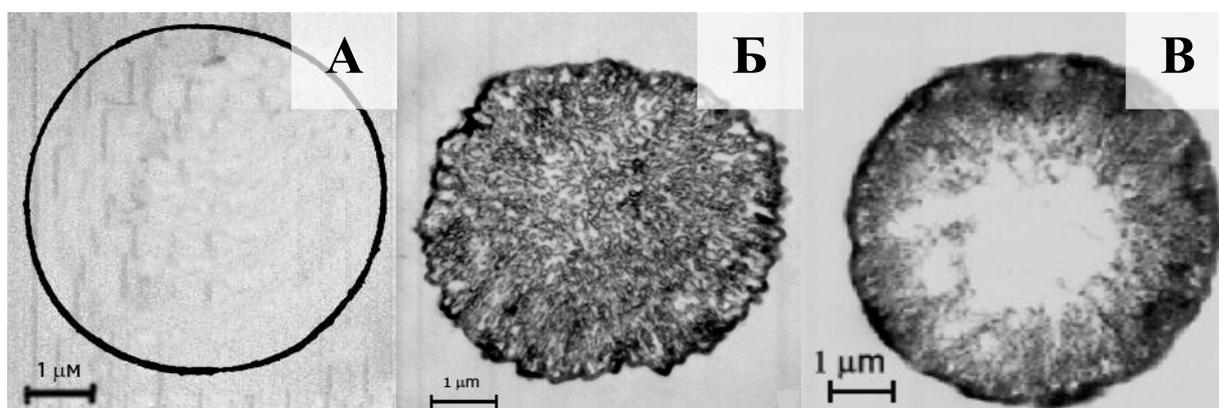


Рисунок 2. Микрофотографии полиэлектролитных капсул трех типов.
А - Полая капсула Б - Условно полая капсула заполненная интерполиэлектролитным комплексом В - Капсула, заполненная белком (Kazakova et al., 2007b)

В качестве ядра для создания микрокапсулы могут использоваться разнообразные коллоидные частицы: латексные (Sukhorukov et al., 1998a), кремниевые частицы (Postma et al., 2009), кристаллы органических молекул (Caruso et al., 2000), микрочастицы из полигидроксикарбоновых кислот (Shenoy et al., 2003), микроагрегаты ДНК и белков (Trubetskoy et al., 1999; Balabushevitch et al., 2001) и неорганические карбонатные матрицы (Alexei A Antipov et al., 2003), а также инкапсулирования эмульсий типа масло – вода (Sadovoy et al., 2011) В качестве ядра наибольшее распространение получили частицы карбоната кальция (CaCO_3 -частицы). Благодаря своей пористой структуре они могут удерживать в порах активные вещества, при этом их растворение происходит в сравнительно “мягких” условиях при помощи раствора этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) (Sukhorukov et al., 2004).

Микрокапсулы первого типа – полые микрокапсулы. Для их образования применяют ядра, не имеющие пор, например, кремниевые (Postma et al., 2009) или латексные частицы (Sukhorukov et al., 1998a), которые растворяются после нанесения необходимого числа слоев полимера. Инкапсуляция веществ в такие капсулы может осуществляться путём временного изменения проницаемости оболочки микрокапсул, варьированием состава среды, для поступления во внутреннюю полость требуемого вещества или при добавлении требуемого вещества в момент нанесения полиэлектролитных слоёв (Déjugnat, Sukhorukov, 2004; Shchukin et al., 2004; Postma et al., 2009).

Микрокапсулы второго типа – капсулы, сформированные на CaCO_3 ядре, имеющие сложную внутриобъемную организацию, обусловленную тем, что при нанесении полиэлектролита, он проникает в пористую структуру ядра и формирует интерполиэлектролитный комплекс, заполняющий микрокапсулу (Дубровский и др., 2008). Инкапсуляция веществ в такие капсулы происходит после разрушения ядра, при помещении капсул в раствор,

где требуемое вещество абсорбируется в «губчатую» структуру капсулы из водного окружения.

Микрокапсулы третьего типа – капсулы, сформированные на составном сферолите CaCO_3 –белок, у которых отсутствует сложная внутриобъемная структура, а внутреннее пространство заполнено инкапсулированным веществом (Дубровский и др., 2008). Загрузка капсулы требуемым веществом происходит на стадии подготовки ядра до нанесения полиэлектролитов. Вещество либо сорбируется ядром, на поверхности которого потом послойно формируется капсула (метод адсорбции), либо ядро формируют в растворе требуемого вещества (метод копреципитации) (Kochetkova et al., 2013).

3.3.2. Свойства полиэлектролитной оболочки

Свойства оболочки микрокапсул на прямую зависят от составляющих её полиэлектролитов. Это полимеры, которые содержат ионогенные функциональные группы, а их соли способны к электролитической диссоциации, таким образом, при диссоциации полиэлектролиты распадаются на макроионы и низкомолекулярные противоионы. По степени диссоциации полиэлектролиты подразделяют на слабые (полиакриловая к-та, поливиниламин, полилизин, полиаллиламин), у которых в диапазоне рН от ~ 2 до ~ 10 диссоциации подвергается лишь часть ионогенных звеньев, и сильные (полистиролсульфонат натрия, полифосфат натрия), которые в этом диапазоне диссоциируют практически полностью. Для формирования полиэлектролитной оболочки, в зависимости от поставленных целей, используют разные типы полиэлектролитов, так, из сильных полиэлектролитов получают капсулы с лучшей коллоидной стабильностью, из слабых – более термостабильные микрокапсулы с более высокой эффективностью инкапсуляции (Köhler et al., 2005, 2006; Mak et al., 2008). Полиэлектролитная пара – слабого полиэлектролита ПАА и сильного ПСС

наиболее популярна для изготовления капсул с хорошей коллоидной и температурной стабильностью и эффективностью инкапсуляции.

Полиэлектролиты также можно разделить на биodeградируемые и на небиodeградируемые. Микрокапсулы, состоящие из небиodeградируемых полиэлектролитов, например, из ПСС и ПАА, не подвержены разложению под действием протеолитических ферментов (Santos et al., 2012). Такой тип микрокапсул целесообразен для применения в условиях, не требующих их дальнейшего удаления из среды, например, для создания сенсорных систем и биореакторов. Биodeградируемые микрокапсулы состоят из биоразлагаемых полиэлектролитов и разрушаются под действием протеолитических ферментов, такого рода микрокапсулы могут использоваться в качестве контейнеров для адресной доставки лекарственных препаратов. Чаще всего они содержат такие полимеры, как альгинат натрия, полилизин (ПЛиз), полиаргинин (ПАрг), декстрансульфат (ДС) (Santos et al., 2012; Yu et al., 2016).

Внутренняя организация полиэлектролитов внутри микрокапсул изучалась в исследовании Дубровского с соавторами (Дубровский и др., 2008). При анализе ультратонких срезов капсул различных типов, на основе ПАА и ПСС, было установлено, что в случае капсул заполненных интерполиэлектролитным комплексом (капсул 2-го типа), при достижении 9 слоев формируется внешняя полиэлектролитная оболочка. Как было отмечено выше, в отличие от капсул 2-го типа, капсулы 3-го типа, заполненные белком, имеют распределение полимера в приповерхностном слое. Внешняя оболочка таких капсул фрагментарно формируется уже при 6 слоях полимера, а при достижении 8 слоев становится равномерной, что свидетельствует о регулярности расположения полиэлектролитных цепей. При анализе данных авторы приходят к выводу о тонкой организации нанослоевой оболочки микрокапсулы, состоящей в большей степени из интерполиэлектролитных дуплексов и имеющей на своей поверхности участки молекул полиэлектролитов, несвязанные комплементарно с противоположно заряженными полиэлектролитными нитями (Дубровский и др., 2008).

В исследовании Антипова с Сухоруковым (Antipov et al., 2001) изучалось влияние числа слоев оболочки ПМК на её проницаемость. В качестве полиэлектролитов для приготовления капсул были выбраны ПАА и ПСС, а в качестве инкапсулируемого вещества – флуоресцеин. Флуоресцеин был инкапсулирован при низких рН, при которых он не растворим, после чего измерялась скорость его выхода из ПМК в среду. Авторами установлено, что для капсул с количеством слоев от 8 до 18 скорость выхода вещества (скорость прохождения в-ва сквозь оболочку ПМК), измеряемая по флуоресценции супернатанта, постоянна и составляла примерно от 2×10^{-9} до 7×10^{-9} м/с. Наибольшее влияние нового слоя ПМК на снижение проницаемости оказывается до 8 слоев, при последующем увеличении их количества, вплоть до 18, влияние не значительно. Авторы приходят к выводу, что в первую очередь эффект связан с различиями в конформации и плотности упаковки внутренних и внешних слоев (Antipov et al., 2001).

Полиэлектролитные микрокапсулы всех типов активно поглощаются клетками иммунной системы, в случае их применения в качестве средств адресной доставки это обстоятельство является негативным фактором. Возможно снижение заметности микрокапсул для иммунной системы, для этого оболочка капсулы может быть дополнительно покрыта полиэтиленгликолем (ПЭГ), что уменьшает агрегацию капсул и упрощает их распределение в системе кровообращения, а также снижает адсорбцию белка на поверхность капсул, что позволяет отсрочить иммунный ответ (Wattendorf et al., 2008).

Полиэлектролитная оболочка микрокапсул как из биodeградируемых, так и из небиodeградируемых полимеров может содержать дополнительный набор включений, например, ферромагнитные частицы, для управления микрокапсулами при помощи магнитного поля, что позволяет адресно доставлять и высвободить препарат в патологическом очаге (De Cock et al., 2010; Букреева и др., 2011), диоксид титана или серебра — для их контролируемого разрушения ультрафиолетом или лазером (Bédard et al.,

2010; Демина и др., 2014), или флуоресцентные метки, необходимые для детекции и контроля доставки (Kazakova et al., 2011). Микрокапсулы с дополнительными включениями называются композитными и подробнее рассматриваются в следующих главах.

3.3.3. Влияние факторов среды на полиэлектролитные капсулы

Влияние рН. Как было отмечено в предыдущей главе варьирование рН среды может приводить к повышению проницаемости ПМК, в частности с этим связан один из способов загрузки капсул молекулярным грузом. Ионизационные свойства слабых полиэлектролитов легко изменяемы: сдвиг значения рН, таким образом, может вызывать накопление не скомпенсированных отрицательных или положительных зарядов внутри полиэлектролитной оболочки (Déjugnat, Sukhorukov, 2004). При рН, близком к точке перезарядки полиэлектролитов, полиэлектролитная оболочка «разрыхляется» и увеличивается в размерах, становясь при этом проницаемой для высокомолекулярных соединений, данный принцип, как отмечалось выше, может использоваться для загрузки капсул веществом. Доведение рН среды до точки перезарядки полиэлектролитов приводит к невозстановиваемому распаду капсул (Shiratori, Rubner, 2000; Déjugnat, Sukhorukov, 2004; Déjugnat et al., 2005).

Условия, обеспечивающие проницаемость ПМК, различны для каждой полиэлектролитной пары в их составе и зависят от типа полиэлектролита. Это дает возможность конструирования капсул с рН-откликом, отвечающим требованиям конкретных прикладных задач. Капсулы с рН-зависимой способностью высвобождения активных компонентов, основанной на вышеизложенном принципе, могут быть применены с целью создания средств контролируемой доставки лекарственных препаратов (Yun and Kim, 2010).

Влияние полярности раствора. Многие полиэлектролиты обладают достаточно высокой растворимостью в органических растворителях. Если такие полиэлектролиты использовать при создании ПМК, то на такие капсулы

можно влиять, меняя свойства окружающего растворителя. Так, на примере многослойной пленки состава ПАА/ПСС, по структуре аналогичной стенке ПМК, приготовленной при высоком содержании этанола в среде, было показано, что понижение концентрации спирта в окружающем растворе приводит к росту проницаемости пленки, а при достижении определенной концентрации (24%) наблюдается её деградация (Krasemann, Tiede, 1998).

В работе (Lvov et al., 2001) эффект аналогичного влияния показан для капсул: капсулы состава ПСС/ПАА в воде не проницаемы для белка, а при добавлении этилового спирта разрыхляются и начинают пропускать его. Исследователями было установлено, что такое изменение структуры является обратимым. На основе этих данных авторами было предложено использовать полярность раствора как один из способов загрузки веществ в ПМК.

Влияние ионной силы. Важным является изучение влияния присутствия ионной силы на проницаемость и морфологию полиэлектролитных капсул. Влияние ионной силы обусловлено экранированием ионами заряженных групп полиэлектролитов (Büscher et al., 2002). Присутствие соли в среде способно существенно увеличивать проницаемость полимерных слоев благодаря разрыву ионных связей между противоположно заряженными полиэлектролитами, так, в работе Антипова (Antipov et al., 2002), было показано, что добавление 0,5М NaCl увеличивает проницаемость ПМК для флуоресцеина. Так же в статьях Сухорукова (Sukhorukov et al., 1996) и Клитцинг (Klitzing, Möhwald, 1996) показано, что добавление соли приводит к нарушению границ между слоями полиэлектролитов, в то время как внешне толщина оболочки не меняется. Таким образом перегруппировка полиэлектролитов в оболочке капсулы, вызванная ионной силой раствора, приводит к образованию локальных дефектов, способствующих увеличению проницаемости ПМК, это свойство авторы использовали для загрузки капсул макромолекулами и для их контролируемого высвобождения, однако практическое применение данного метода существенно ограничено отсутствием линейной зависимости

проницаемости оболочки капсулы от концентрации соли и низкой общей эффективностью загрузки.

Влияние температуры. Большинство полиэлектролитных микрокапсул термодинамически стабильны при температурах ниже 30°C, однако с повышением температуры наблюдается процесс постепенной перегруппировки слоёв и сжатие капсул. При этом одновременно происходит уменьшение размера (диаметра) капсул и увеличение толщины и плотности полиэлектролитной оболочки. Эффект связан с подвижностью и взаимопроникающей диффузией полимерных цепей (Soltwedel et al., 2010). Продолжительный нагрев выше 35°C приводит к уплотнению полиэлектролитной оболочки и увеличению её механической прочности (Köhler, Sukhorukov, 2007), а при нагревании ПМК до температуры стеклования возможно образование герметичных структур (Köhler et al., 2005).

В работе Кохлер (Köhler et al., 2005) влияние температуры на размер капсул объясняется стремлением системы минимизировать свободную энергию, что сопряжено с увеличением подвижности полиэлектролитов. Продемонстрировано, что капсулы, имеющие четное число полиэлектролитных слоев, то есть примерно равное количество поликатиона и полианиона при нагревании уплотняются и сжимаются. Такая реорганизация структуры направлена на минимизацию взаимодействия полиэлектролитов с водой. Капсулы с нечетным числом слоев (т.е. содержащие не равное количество поликатионов и полианионов), в тех же условиях расширялись, и их оболочка становилась тоньше — не скомпенсированные электростатические заряды разрыхляли оболочку, и энергия в системе оптимизировалась за счёт уменьшения их плотности, т.е. за счёт расширения капсулы.

Аналогичные данные были получены в исследовании Дубровского с соавторами (Дубровский и др., 2008), при этом было продемонстрировано что

термочувствительность капсул практически не зависит от заполненности их белком или интерполиэлектrolитным комплексом.

3.3.4 Декапсуляция веществ из полиэлектrolитных микрокапсул

При применении ПМК в качестве микроконтейнеров, для адресной доставки, одним из наиболее значимых вопросов является способ высвобождения ЛП. Декапсуляция веществ из полиэлектrolитных микрокапсул — это триггерное нарушение целостности оболочки полиэлектrolитных микрокапсул, которого достаточно для высвобождения вещества в окружающую среду. Разрушение оболочки может быть вызвано воздействием: ферментов, ультразвука, нагревания, магнитного поля, кислотности среды, ионной силы раствора и светового излучения.

Возможность варьировать состав оболочки микрокапсул позволяет создавать ПМК способные высвобождать инкапсулированное вещество при определенных условиях. Декапсуляция необходима для создания средств адресной терапии, которая заключается в доставке ЛП к определенным органам или тканям и его высвобождении. Данный подход позволяет минимизировать побочные эффекты ЛП и уменьшить период восстановления пациента. Кроме того, постепенное высвобождение небольших доз ЛП позволит увеличить период его воздействия на организм, например, постепенное высвобождение инсулина в кровь. Кроме того, данная технология используется для создания самовосстанавливающихся материалов, пестицидных препаратов и культивации клеточных культур.

Кислотность среды (pH). Изменение проницаемости ПМК при изменении pH в первые было продемонстрировано Антиповым с соавторами в 2002 году (Antipov et al., 2002). Исследователями показано, что в случае микрокапсул, состоящих из ПАА и ПСС, проницаемость капсул снижается при pH выше 8 и повышается в pH ниже 6. На примере декстрана с ФИТЦ

меткой, показана возможность рН-контролируемой загрузки и извлечения молекул из микрокапсул (Antipov et al., 2002).

Другой принцип влияния рН, показан в работе Шен с коллегами (Shen et al., 2013). Авторы исследования использовали ПМК, содержащие внутри гелеобразный БСА. Такие капсулы были получены при нагревании ПМК, заполненных БСА, до 80°C; при этом внутри капсул образуется гель, который является полиамфолитом и меняет свой заряд в ответ на изменение рН раствора. Эффективность метода была показана на примере доксорубина, загрузка которого в капсулу происходила при значении $\text{pH} > 4,8$, когда доксорубин имеет положительный заряд, а БСА - отрицательный, и таким образом создаётся электростатическое взаимодействие между ними. При снижении кислотности заряд БСА меняется на положительный, электростатическое взаимодействие с доксорубином ослабевает, что приводит к его высвобождению из капсулы. Потенциально данный метод можно использовать и для обратных ситуаций: загрузке при низком рН, если загружаемое вещество имеет отрицательный заряд, и декапсуляция вещества при более высоких значениях кислотности среды, при которых БСА будет менять свой заряд на отрицательный (Shen et al., 2013)

Ионная сила раствора. В отличие от рН-контролируемой декапсуляции высвобождение содержимого из микрокапсул под действием ионной силы раствора может происходить для ПМК, содержащих в составе как слабые, так и сильные полиэлектролиты. Антипов с группой (Alexei A. Antipov et al., 2003) показали, что влияние ионной силы на ПМК схоже с влиянием кислотности среды: при повышении ионной силы раствора, происходит снижение свободной энергии взаимодействий внутри полиэлектролитных слоёв, что повышает проницаемость капсулы, а в работе (Klitzing, Möhwald, 1996) было показано, что увеличение ионной силы раствора приводит к образованию локальных дефектов и, как следствие увеличению проницаемости. Однако, из-за отсутствия линейной зависимости проницаемости оболочки капсулы от концентрации соли и невозможности

использования данного подхода к контролируемой декапсуляции *in vivo*, его применение существенно ограничено.

Содержание глюкозы. Идея глюкозо-зависимого высвобождения ЛП появилась при разработке эффективной терапии инсулин-зависимого диабета. В работе ДеГист (Bruno G. De Geest et al., 2006) были сконструированы полиэлектролитные микрокапсулы, с полимером чувствительным к уровню глюкозы. В их основу легли полистиролсульфонат и сополимер диметиламиноэтилакрилата с 3-акриламидофенилбороновой кислотой. Компонентом, чувствительным к содержанию глюкозы, здесь является производная фенилбороновой кислоты: она способна формировать комплекс с глюкозой, причём реакция вызывает сдвиг равновесия в сторону заряженных молекул кислоты. Это приводит к увеличению электростатического напряжения, отталкиванию слоёв капсулы друг от друга и, в итоге, к деградации стенки капсул (Bruno G. De Geest et al., 2006).

В исследовании Леви (Levy et al., 2008) была создана система, в основу которой легло формирование эфирных связей между полисахаридами и производными фенилбороновой кислоты. В состав ПМК в данном случае вошли комплексы полиакриловой кислоты с гемисульфатом аминокислоты, формирующие эфирные связи с маннаном. При повышении концентрации простых сахаров (фруктоза, глюкоза, манноза и галактоза) в растворе наблюдалось разрушение стенки микрокапсулы. Вероятно, это происходит за счёт вытеснения простыми сахарами маннанов из комплексов с производными фенилбороновой кислоты, что приводит к дестабилизации слоев стенки капсулы и к её разрушению (Levy et al., 2008).

Световое воздействие. Воздействие светом является довольно удобным способом регулировать декапсуляцию веществ. Например, в работе Катагири (Katagiri et al., 2009) исследователи создали УФ-чувствительные ПМК, оболочка которых состояла из слоев полистеролсульфоната и полидиаллилдиметиламмония, покрытых двуслойной липидной оболочкой и соединениями $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$. В работе было показано, что инкапсулированные

низкомолекулярные вещества могут высвободиться под направленным действием УФ-излучения благодаря фотокаталитической активности соединения TiO_2 , приводящей к деградации полиэлектролитных слоев капсулы. Скорость разрушения капсулы и, следовательно, высвобождения веществ регулировалась соотношением оксидов SiO_2 и TiO_2 во внешнем слое капсулы (Katagiri et al., 2009). Другой пример УФ-чувствительных капсул показан в работе Ку (Koo et al., 2010). Авторы создали ПМК, содержащие во внешнем слое фоточувствительные генераторы (photoacid generators, PAGs). При воздействии УФ-излучения на такие капсулы происходит высвобождение протонов PAGs во внешнюю среду, что приводит к локальному снижению pH раствора, таким образом длительное воздействие УФ, обуславливает поддержание низких значений pH, что приводит к тому, что ПМК увеличиваются в размерах и разрушаются (Koo et al., 2010).

В качестве отдельного примера использования УФ-излучения для контролируемого декапсулирования содержимого микрокапсул можно привести работу Парк (Park et al., 2005), в которой для сборки ПМК авторы использовали фоточувствительный бензофенон-модифицированный ПАА и ПСС. При УФ-облучении протон из связей C-H, присутствующих в оболочке капсулы, легко отделяется возбужденным бензофеноном, что приводит к образованию новой связи C-C, между полимерами оболочки. В работе было показано, что время воздействия УФ влияет на степень сшивки и размер пор ПМК, что позволяет контролировать скорость высвобождения препарата из микрокапсулы (Park et al., 2005).

Помимо УФ-излучения для светозависимой декапсуляции веществ также применяется ИК диапазон близкий к видимой части спектра (700–900нм). В отличие от ультрафиолета, ИК не оказывает негативного воздействия на клетки и может проникать достаточно глубоко в ткани организма. В работе Скиртач (Skirtach et al., 2004) были созданы капсулы состоящий из ПАА и ПСС и содержащие либо наночастицы серебра, либо ИК-поглощающие красители. Исследователями показано, что при воздействии на такие микрокапсулы

лазерным излучением ИК диапазона появляются множественные прорывы оболочки ПМК и происходит выход содержащегося внутри капсулы вещества (Skirtach et al., 2004), аналогичный эффект был продемонстрирован Skorb et al. (Skorb et al., 2009), приготовленные ими капсулы, состоящие из ПСС и ПЭИ и модифицированные наночастицами серебра, при обработке ИК лазером образовывали поры достаточные для прохождения антикоррозийного в-ва.

В работе Скиртач (Skirtach et al., 2008) для того чтобы создать ИК-зависимые ПМК, агрегаты из наночастиц золота были встроены в оболочку микрокапсул, состоящих из полидиаллилдиметиламмония (ПДАДМА) и полистиролсульфоната (ПСС). В результате были получены ПМК, обладающие пиком поглощения в ИК спектре. ИК излучение поглощается частицами золота, которые при этом нагреваются, что приводит к локальному плавлению полимерных слоев и повышению их проницаемости, при этом прекращение светового воздействия приводит к возврату проницаемости оболочки ПМК к прежним значениям (Skirtach et al., 2008).

Широкое распространение данный метод декапсуляции получил при применении ПМК в фототермальной терапии рака. При этом создается двойное воздействие на раковые клетки - через химиотерапевтический препарат и через нагревание микрокапсул. В одном из последних исследований, по данному направлению, был показан высокий потенциал таких ИК поглощающих ПМК и лазерной активации декапсуляции для применения в противораковой терапии (Sharma et al., 2020). Авторам работы удалось создать ПМК, содержащие в себе два действующих вещества, гидрофильный доксорубин и гидрофобный противораковый препарат нимбин, декапсуляция которых происходит под действием близкого к ИК лазерного излучения, причём, в отличие от других работ, исследователями была продемонстрирована возможность применения лазера слабой мощности (0.5Вт) (Sharma et al., 2020).

Ультразвук. Поскольку ультразвуковые процедуры повсеместно одобрены для медицинского использования, применение ультразвука для

контролируемого высвобождения веществ из ПМК оказалось весьма привлекательным с точки зрения изученности и безопасности для человеческого организма. В целом влияние ультразвука на проницаемость микрокапсул осуществляется через эффект кавитации в жидкой среде при воздействии ультразвуковых колебаний с частотой 20 кГц и более. При прохождении ультразвуковой волны, в жидкой среде образуются микропузырьки из растворенных в среде газов. При дальнейшем воздействии ультразвука микропузырьки осциллируют и схлопываются, — это и есть явление кавитации. Схлопывание пузырьков в жидкости вызывает перераспределение энергии в среде, что приводит к созданию дополнительных сил сдвига между слоями жидкости (Rae et al., 2005). В результате данного процесса возможно нарушение оболочки ПМК и её разрушение. Большинство работ в этой области было сделано на основе ПМК, содержащих полистиролсульфонат (ПСС) в качестве полианиона и полиаллиламин (ПАА) в качестве поликатиона. Одним из первых исследований в данной области стала работа Скиртач (Skirtach et al., 2007). На примере FITC-dextran авторами установлена возможность декапсуляции веществ из капсул ультразвуком, а также доказано, что присутствие в составе оболочки наночастиц серебра увеличивает чувствительность ПМК и скорость их разрушения. Аналогичные результаты декапсуляции FITC-dextran также были получены в работе Anandhakumar et al. (Anandhakumar et al., 2012) с капсулами ПАА/ДС, содержащими частицы серебра. Другой ранней работой в области ультразвук-чувствительных ПМК стала работа Щукина (Shchukin et al., 2006), в которой авторы использовали те же поликатионы и полианионы для сборки ПМК, но в один из срединных слоёв ввели оксид железа (II-III) — Fe_3O_4 . Введение оксида железа увеличило восприимчивость микрокапсул к воздействию ультразвуковых колебаний. Наибольшее влияние на чувствительность ПМК к ультразвуку было продемонстрировано в работе Колесникова с коллегами (Kolesnikova et al., 2010), в которой авторы использовали частицы оксида цинка в составе капсул ПАА/ПСС.

Стоит отметить, что не всегда наличие металлов в составе капсулы влияет на чувствительность ПМК к ультразвуку именно таким образом. Так, например, в работе Де Гист (De Geest et al., 2007) были созданы ПМК содержащие, чувствительные к воздействию ультразвуковых волн, и содержащие в составе наночастицы золота и FITC-dextran в качестве объекта декапсуляции. Для формирования капсул авторы использовали ПСС и ПАА для одного типа частиц, и ПАА вместе с наночастицами золота, на поверхности которых закреплены карбоксильные группы, в качестве аниона, для другого типа частиц. При сравнении чувствительности разных ПМК к ультразвуку обнаружили, что ПМК, содержащие в своём составе золотые наночастицы, устойчивее переносят воздействие ультразвука, вероятно, благодаря полианионным карбоксильным группам, придающим жёсткости многослойной структуре оболочки микрокапсулы (De Geest et al., 2007).

Магнитное поле. В качестве ещё одного индуктора контролируемого высвобождения веществ из ПМК применяют магнитное поле. Основным преимуществом этого метода является проницаемость тканей организма для магнитных полей. В одной из первых работ по этой теме Карузо с коллегами (Caruso et al., 1999) были приготовлены ПМК, которые помимо полиэлектролитов содержали в своём составе Fe_3O_4 , а также обладали полистироловым ядром. Однако, возможность контролируемой декапсуляции под действием магнитных сил была впервые исследована в 2005 году Лу с соавторами (Lu et al., 2005). Для этой цели использовались капсулы с FITC-dextran, состоящие из ПАА и ПСС, в стенки которых встраивались наночастицы кобальта, покрытые золотом. При приложении магнитного поля наночастицы начинали вращаться с частотой, соответствующей частоте осциллирующего магнитного поля. Таким образом, эти частицы дестабилизировали прилегающие полиэлектролитные слои и увеличивали проницаемость стенки ПМК. При этом было показано, что в увеличении проницаемости есть предел, обусловленный скоростью вращения наночастиц — если частота магнитного поля будет слишком высокой, то наночастицы уже

не будут успевать вращаться с такой же частотой и увеличение проницаемости будет минимальным. В дальнейшем, возможная перспектива прикладного применения капсул с наночастицами оксида железа была продемонстрирована в исследовании Зенг (Zheng et al., 2014). Группой были оптимизированы условия загрузки магниточувствительных ПМК инсулином, после чего продемонстрирована возможность магнитноконтролируемой декапсуляции, таким образом была показана возможность применения данной технологии в терапии диабета.

Для осуществления адресной доставки ЛП, немаловажным является создание микрокапсул пониженной проницаемости, способных удерживать низкомолекулярные соединения, такие капсулы стали предметом исследования Катагири с коллегами (Katagiri et al., 2010), ими были созданы усовершенствованные магниточувствительные ПМК с Fe_3O_4 , содержащие билипидный слой в качестве внешней оболочки, такие микрокапсулы могут использоваться для транспорта субстратов с различной молекулярной массой. При воздействии на эти капсулы магнитного поля, магнитные наночастицы Fe_3O_4 повышали проницаемость билипидного слоя капсулы за счёт нагревания наночастиц, а не за счёт их движения (Katagiri et al., 2010).

На данный момент получены ПМК, содержащие магнитные частицы как в оболочке, так и в составе ядра микрокапсул. В работе Ху (Hu et al., 2015), были созданы микрокапсулы, содержащие пентакарбонил железа $Fe(CO)_5$. В процессе создания микрокапсулы чувствительное к магнитным полям ядро изготавливалось из пентакарбонила железа и оксида кремния, после чего происходило послойное нанесение слоёв полиэлектролита. На финальном этапе оксид кремния вымывается из капсул с помощью раствора гидроксида натрия. В исследовании было показано, что полученные таким образом капсулы деформируются под действием постоянного магнитного поля, что, в свою очередь, приводит к высвобождению содержимого. В данном случае существует возможность регуляции декапсуляции изменением силы

магнитного поля: чем больше сила прикладываемого поля, тем интенсивнее идёт декапсуляция (Hu et al., 2015).

Аналогичный способ “настраивать” магниточувствительные микрокапсулы был разработан группой Каригал-Ромеро (Carregal-Romero et al., 2015). Исследователями были созданы микрокапсулы, содержащие в своей оболочке магнитные частицы оксида железа кубической формы, которая повышает их способность нагреваться под действием переменного магнитного поля. Ещё один альтернативный способ регуляции декапсуляции основан на возможности менять концентрацию магнитных частиц в стенке капсулы (Katagiri et al., 2011). Чем больше концентрация магнитных частиц в оболочке капсулы, тем выше суммарная теплоёмкость системы и тем больших температур можно достичь при применении к этим капсулам магнитного поля. Локальное повышение температуры в оболочке, приводит к нарушению её структуры и как следствие, выходу инкапсулированного в-ва (Katagiri et al., 2011).

Декапсуляция магниточувствительных микрокапсул, таким образом можно разделить на две категории, в первой, используется действие переменного магнитного поля, которое приводит к увеличению подвижности и нагреву магнит чувствительных частиц (Lu et al., 2005; Hu et al., 2008; Katagiri et al., 2011), приводящую к разрушению всей или части оболочки. Такой подход локально повышает температуру, что потенциально может нанести вред здоровым органам, следовательно, накладывает ограничение на клиническое применение. Второй подход заключается в использовании постоянного магнитного поля, которого может быть достаточно для деформации капсул без их нагревания (Degen et al., 2008; Patel et al., 2008; Long et al., 2015), однако такой подход, как правило, требует микрокапсул приготовленных с использованием методов эмульгирования с размерами от десятков до сотен микрометров, такой размер капсул существенно ограничивает возможность их применения в адресной доставке лекарств.

Окислительно-восстановительный потенциал. Поскольку

окислительно-восстановительный потенциал в разных органеллах клетки отличается, разрабатываются ПМК, чувствительные к данному типу воздействий. Одной из первых в этой области стала работа, посвящённая созданию ПМК, которые помимо молекул полиэлектролитов содержат в оболочке остатки цистеина (Haunie et al., 2005). При помещении капсул в окислитель DMSO, между цистеинами формируются дисульфидные связи, которые увеличивают стабильность стенки ПМК для воздействия низких значений pH. Однако, если поместить такие капсулы в восстанавливающие условия среды TSEP, то дисульфидные связи распадаются и оболочки капсул становятся подвержены кислотному воздействию. Подобная система создаёт возможность высвобождения содержимого при воздействии двух факторов: окислительно-восстановительного потенциала и кислотности среды (Haunie et al., 2005).

В другом исследовании были созданы ПМК, способные высвобождать содержимое только под действием восстановительной среды. Зеликин с группой (Zelikin et al., 2006b) создали микрокапсулы на основе поливинилпирролидона и полиметакриловой кислоты, модифицированной тиольными группами. При дальнейшей подготовке ПМК помещались в сильные окислительные условия (воздействия пероксида водорода) для образования дисульфидных связей между тиольными группами. Авторами было показано, что при воздействии на полученные капсулы восстанавливающими агентами, такими, как дитиотриетол (ДТТ) стенка капсулы постепенно деградировала, высвобождая содержимое (Zelikin et al., 2006b).

Отдельного упоминания заслуживает использование данных ПМК в качестве потенциальных переносчиков пептидных вакцин. В *in vitro* исследовании Rose et al. (De Rose et al., 2008). было показано, что ПМК, загруженные полипептидами, могут устойчиво циркулировать в человеческой крови и поглощаться антиген-презентирующими клетками (АПК). Благодаря

восстановительной среде внутри клеток, содержимое капсулы высвобождается и может быть представлено АПК в составе главных комплексов гистосовместимости (De Rose et al., 2008).

Энзиматическое разрушение. Альтернативным способом декапсуляции веществ является энзиматическое разрушение оболочки ПМК. Это может быть удобным способом доставки ЛП, если он должен действовать внутри клетки - например, в случае, олигонуклеотидов или белков. Первым примером стали ПМК в работе De Geest et al. (De Geest et al., 2006). Авторами были созданы два типа капсул: с оболочкой из полиаргинина и декстран сульфата и с оболочкой из полигидроксипропилметакриламида диметиламиноэтил и ПСС. Эти капсулы были испытаны на живой культуре почечных клеток зеленой обезьяны. Было показано, что данные ПМК активно поглощаются клетками, при этом происходит энзиматическая деградация оболочки капсулы и выход содержимого (De Geest et al., 2006). Этот тип капсул в дальнейшем был испытан *in vivo*, в экспериментах с мышами (De Koker et al., 2007).

Другой пример энзиматической декапсуляции ПМК разработан в исследовании Итона с соавторами (Itoh et al., 2006). Авторами были получены микрокапсулы на основе хитозана и декстран сульфата, а в качестве агента декапсуляции использовали фермент хитозаназу. Было показано разрушение оболочки капсулы и контролируемое высвобождение ЛП из капсулы под действием фермента. Однако, авторы исследования решили пойти дальше и попытаться оптимизировать систему так, чтобы высвобождение препарата происходило медленнее (т.н. *sustained release* - длительное выделение). Для этого в состав капсулы внесли дополнительный внешний слой хитозана, имеющего положительный заряд. В буфере реакции (рН 5.6) хитозаназа (рИ 9.3) также имеет положительный заряд, поэтому взаимодействие фермента с модифицированными капсулами было ослаблено из-за электростатического отталкивания (Itoh et al., 2006).

Большинство разработок в области энзиматического разрушения связано с использованием двух литических ферментов, вырабатываемых в организме

человека: пепсина (в желудке) и гиалуронидазы (в слюнных и семенных железах). Для создания пепсин-зависимых капсул использовались хитозан и поли(2-акриламидо-2-метилпропансульфоновая) кислота. Было показано, что под действием пепсина происходил распад оболочки ПМК и высвобождение инкапсулированного индометацина (Wang et al., 2007). Гиалуронидаза-зависимые ПМК содержат в составе оболочки остатки гиалуроновой кислоты (Lee et al., 2007; Szarpak et al., 2010) или хондроитин сульфата (Radhakrishnan et al., 2013).

Как было показано Кардусо (Cardoso et al., 2016), энзиматическое разрушение капсул может быть обусловлено не только воздействием литических ферментов на капсулу из внешней среды, но также и воздействием инкапсулированных ферментов на оболочку изнутри. Одним из примеров таких капсул могут стать уже описанные выше капсулы, состоящие из хитозана и гиалуроновой кислоты. Вместе с ЛП авторы вводили в полость капсулы гиалуронидазу для контролируемого распада стенки капсулы (Cardoso et al., 2016). Другим примером такой системы могут служить ПМК, описанные в работе Бородиной (Vorodina et al., 2007). Исследователями была создана оболочка капсулы, состоящая из поли-L-аргинина и поли-L-аспарагиновой кислоты. В качестве декапсулирующего агента, заключённого внутрь капсулы, использовалась смесь литических ферментов из *Streptomyces griseus* под названием Pronase(c). Авторы также показали, что можно осуществлять тонкую настройку скорости деградации через изменение содержания Pronase(c) внутри капсулы.

Осмотическое давление. Основной принцип применения осмотического давления для декапсуляции заключается в том, чтобы внутрь капсулы поместить гидрогель из биodeградебельного материал (декстран и его производные). В воде внутрь капсулы под действием осмотических сил поступает вода, повышается внутреннее осмотическое давление на стенки капсулы, и под его действием оболочка разрывается, это происходит, потому что Dextran гидролизуеться со временем. Настройку времени декапсуляции

можно осуществлять путём изменения количества сшивок в полиэлектролитных слоях, количества самих слоёв и количества биodeградебельного геля внутри (De Geest et al., 2005; De Geest et al., 2006).

3.3.5 Применение полиэлектролитных микрокапсул в качестве микроконтейнеров

Доставка ЛП. Применение полиэлектролитных микрокапсул имеет большие перспективы развития в области адресной доставки лекарственных препаратов. ПМК могут быть использованы для доставки медицинских препаратов в очаг заболевания и создания препаратов пролонгированного действия (De Geest et al., 2005). Наибольший интерес вызывает применение капсулированных форм белков и пептидов. Этот класс соединений обладает широким спектром применения в живых организмах, а разработка лекарственных препаратов на их основе является одной из наиболее быстро развивающихся областей современной фармакологии, однако из-за низкой стабильности, клиническое применение белков существенно ограничено (Nevozhay et al., 2007).

Возможность инкапсуляции белка с целью его дальнейшей адресной доставки, показана на примере химотрипсина в качестве модельного объекта Бородиной с соавторами (Бородин и др., 2007). Химотрипсин является эндопептидазой, способной к расщеплению некротизированных тканей и фибриновых образований (тромбов и сгустков крови), однако его применение в наивной форме сопряжено с аллергическими реакциями, сильным жжением и кровотечениями, в связи с этим свободная форма химотрипсина непригодна для внутривенного введения. Для инкапсулирования химотрипсина, с целью его локализации, были сконструированы биodeградируемые капсулы на основе альгината натрия и поли-L-лизина с иммобилизацией энзима в CaCO₃ ядра. После высвобождения из ПМК химотрипсин демонстрировал практически полное сохранение активности (86% по сравнению с нативным

ферментом), что делает разработку перспективной для применения в лечении тромбозов (Бородина и др., 2007).

В статье Зханг с соавторами (Zhang et al., 2010) в состав биodeградебельных ПМК из поли-L-лизина и поли-L-глутаминовой кислоты успешно были включены морфогенный белок фактора роста кости 2 и трансформирующий фактор роста бета 1. Применение данного препарата изучается с целью увеличения скорости восстановления костей при переломах. На предварительных испытаниях *in vitro* он продемонстрировал успешную индукцию образования кости из стволовых клеток (Zhang et al., 2010).

В работе Юринской (Yurinskaya et al., 2017) Изучается возможность инкапсулирования противовоспалительного средства, белка теплового шока 70 (БТШ70). БТШ70 играет важную роль в механизмах защиты клетки не только от теплового, но и других видов стресса, образуя связи с денатурирующими белками и поддерживая их в состоянии, способном к последующему восстановлению. БТШ70 был закапсулирован исследователями в ПМК, для его доставки в клетки. Микрокапсулы были сформированы из декстрансульфата (ДС) и полиаргинина (ПАрг). В ходе исследования был продемонстрирован эффект защиты от активации фагоцитов и снижение образования активных форм кислорода в два раза. При этом отмечается, что белок может быть включен в капсулы наравне с другими препаратами для снижения побочных эффектов от их применения. (Yurinskaya et al., 2017)

Одним из направлений современной медицины, где проблема высокой токсичности препаратов стоит наиболее остро, является современная противораковая терапия. Применение противораковых цитостатиков сопряжено с серьезным негативным воздействием на здоровье пациента. Большинство препаратов являются неселективными и повреждают здоровые клетки человека наравне с клетками опухоли. Возможность локализации таких препаратов позволит увеличить эффективность и безопасность лечения

онкологических заболеваний (Веевник, 2014). Одной из важных особенностей ПМК, обуславливающих их применение в качестве микроконтейнеров, является их активное поглощение некоторыми типами клеток включая клетки рака груди, клетки печени, фибробластами карциномы толстой кишки человека и модельных клеток почки VERO, а также фагоцитирующими, дендритными клетками и макрофагами (Muñoz Javier et al., 2008; De Koker et al., 2009; Szarapak et al., 2010).

Полиэлектролитные микрокапсулы применяются для инкапсуляции ингибитора тирозинкиназы — иматиниба. Инкапсулированный в биodeградируемые микрокапсулы иматиниб разрабатывался как средство терапии хронического миелоидного лейкоза. Инкапсулированный препарат показал медленный выход с высоким уровнем апоптотической эффективности в дозах в 10 раз ниже обычно используемых в клинической практике (Palamà et al., 2010; Vergaro et al., 2011). Аналогичным образом, возможность практического применения ПМК была показана и в опытах с инкапсулированным противораковым ЛП, доксорубецином. Сивакумар с соавторами получили полимерные капсулы из поливинилпирролидона и тиолированной полиметакриловой кислоты, способные высвободить содержимое в кислой среде (Sivakumar et al., 2009).

Вакцины. Как упоминалось выше, полиэлектролитные микрокапсулы любого типа активно поглощаются клетками иммунной системы, что делает их перспективными микроконтейнерами для антигенов, при вакцинации. При применении ПМК, загруженных антигенами, иммунный ответ усиливается вследствие того, что антигены, ассоциированные с микрокапсулами, попадают непосредственно в антигенпредставляющие клетки (Каплун и др., 1999). Первые исследования посвящённые возможности создания усиленных вакцин проводились на липосомах и показывали положительный результат, так, например в Швейцарии одобрено клиническое применение нескольких препаратов подобного типа (Gregoriadis et al., 1989; Gregoriadis, 1995).

Возможность применения ПМК аналогичным образом, была продемонстрирована ДеКокер с соавторами (De Koker et al., 2007). Для создания инкапсулированных вакцин, авторами, рассматриваются ПМК, состоящие из биоразлагаемых полиэлектролитов декстрансульфата и полиаргинина. Было продемонстрировано, что после подкожной инъекции мышам таких микрокапсул, наблюдалась небольшая и локализованная воспалительная реакция, с быстрым появлением гранулоцитов и моноцитов, которые постепенно отфильтровывали всю массу микрокапсул. В достаточно короткий промежуток времени ПМК были захвачены макрофагами, причем капсулы полностью сохраняли свою структуру до поглощения их клетками, но быстро деградировали после поглощения (De Koker et al., 2007). Исследование, капсул такого состава, позже было проведено Сомовым с соавторами (Сомов и др., 2019). В качестве перспективного вакцинного препарата против чумы и туляремии, исследовались ПМК, загруженные антигеном *CafI Yersinia pestis* и кислотонерастворимым антигенным комплексом (КНК) *Francisella tularensis*. В ходе работы было показано, что инкапсулированные препараты, в сравнении с нативными, оказывали более выраженное стимулирующее действие на иммунную систему, индуцируя синтез специфических антител и генерацию клеток памяти иммунитета (Сомов и др., 2019).

На основе ПМК также была создана система для переноса пептидных вакцин. В работе ДеРос (De Rose et al., 2008) исследователями было показано, что ПМК, загруженные полипептидами, могут устойчиво циркулировать в человеческой крови и поглощаться антиген-презентирующими клетками (АПК). Благодаря восстановительной среде внутри клеток, содержимое капсулы высвобождается и может быть представлено АПК в составе главных комплексов гистосовместимости (De Rose et al., 2008). Кроме того, было показано, что некоторые микрокапсулы могут усиливать иммунный ответ при введении одновременно с иммуногеном, то есть выступать в качестве адьюванта (Bachmann and Jennings, 2010).

Генная инженерия. Важным направлением исследований, требующим постоянного совершенствования систем доставки, является генная инженерия. Редактирование генома, помимо работы непосредственно с ДНК, требует ряда решений по преодолению барьеров на пути в целевую клетку. Для этих целей был проведен ряд работ, показывающих возможность практического применения систем внутриклеточной доставки, так, в работе Рейбитанз (Reibetanz et al., 2006), были созданы биоразлагаемые микрокапсулы из протоаминсульфата и декстрансульфата с контролируемым высвобождением плазмид, кодирующих зеленый флуоресцентный белок (GFP), плазмиды, при этом, были адсорбированы между слоями полимеров капсулы. Группой было показано, что поглощение капсул зависит от наружного слоя капсулы и степень поглощения выше в случае, когда наружный слой является поликатионом (Reibetanz et al., 2006).

В аналогичной работе Ломас (Lomas et al., 2011), исследователям удалось создать, загруженные плазмидной ДНК полиэлектролитные капсулы, на основе полиолигоэтиленгликольметакрилата и поли(2-(диизопропиламино)этилметакрилата). Капсулы из этих полимеров стабильны при физиологическом pH, но разрушаются при подкислении до клеточного эндоцитарного pH (Lomas et al., 2011). Аналогичные pH зависимые капсулы, способные высвободить содержимое в кислой среде были созданы в работе Зеликина (Zelikin et al., 2006b) из поливинилпирролидона и полиметакриловой кислоты, модифицированной тиольными группами. На основе этих капсул была разработана система адресной доставки олигонуклеотидных последовательностей ДНК и плазмидной ДНК (Zelikin et al., 2006a, 2007). Возможность обхода иммунной системы, хорошая управляемость и возможность нести одновременно несколько различных генетических векторов, делают ПМК перспективной системой доставки ДНК материала.

Пищевая промышленность. Существует множество работ посвящённых адаптации технологии LbL, для создания микрокапсул пригодных к употреблению в пищу (Yu et al., 2012). В пищевой

промышленности, для построения микрокапсулы наиболее целесообразно использование биосовместимых и биоразлагаемых полимеров, уязвимых, например, к ферментативному воздействию требуется деградация (De Temmerman et al., 2011; Yu et al., 2012).

В исследовании Ношад (Noshad et al., 2015) изучили возможность применения послойного полиэлектролитного метода создания микрокапсул для инкапсуляции ванилина. В качестве материалов стенок капсулы были выбраны изолят соевого белка, крахмал и хитозан. Полученные микроконтейнеры защищали ванилин от температурной деградации при 80°C и могли обеспечить его контролируемое высвобождение. (Noshad et al., 2015)

В работе (Humblet-Hua et al., 2012) из органических полиэлектролитов были созданы микрокапсулы для капель эмульсии. Авторы сравнили механическую стабильность микрокапсул усиленными белковыми фибриллами. В работе применялись микроконтейнеры, собранные из чередующихся слоев комплексов овальбумин– высокометоксилпектин, усиленных фибриллами овальбумина ($L_c \sim 200$ нм), и микрокапсулы, построенные из слоев лизоцима-высокометоксилпектина, усиленных фибриллами лизоцима. Авторы использовали два типа фибрилл лизоцима: короткие и стержнеобразные ($L_c \approx 500$ нм), и длинные полугибкие ($L_c = 1,2–1,5$ мкм). Полученные результаты показали, что при малом количестве слоев (≤ 4) микрокапсулы, построенные при помощи овальбумина прочнее, чем микрокапсулы, полученные из лизоцима, однако, увеличение числа слоев приводит к обратному эффекту. При увеличении числа слоев более стабильными становятся капсулы из слоев лизоцим-высокометоксилпектина (Humblet-Hua et al., 2012).

Огава и его коллеги (Ogawa et al., 2003) продемонстрировали возможность создания стабильных микрокапсул из лецитина, хитозана и пектина. Используя процесс межфазного послойного осаждения, авторам удалось собрать полимерный комплекс на поверхности микрокапель в эмульсии типа "масло в воде". Полученные капсулы обладали хорошей

устойчивостью к агрегации в широком диапазоне значений pH и концентрацией солей (pH 4-8 при 0 мм NaCl и pH 3-8 при 100 мм NaCl) (Ogawa et al., 2003).

Поммерсхайм и др. (Pommersheim et al., 1994) продемонстрировали, что белки могут удерживаться внутри альгинатных микрокапсул при нанесении слоев из поликатиона/полианиона, например, полиэтиленimina, полиакриловой кислоты, поливиниламина, карбоксиметилцеллюлозы и хитозана. Сообщалось, что инкапсуляция альгинатных шариков, содержащих цитохром сводила к минимуму потерю белка при хранении, когда использовались по меньшей мере два двойных слоя поликатион/полианион, однако однослойные мембраны не были способны удерживать цитохром C (Pommersheim et al., 1994).

Способность удерживать белок биоразлагаемыми микрокапсулами из альгината и хитозана была изучена в работе Гасерод (Gåserød, 1999). Исследователи показали, что один двойной слой альгината и хитозана, нанесенный на предварительно сформованные альгинатно-хитозановые капсулы, оказывал незначительное влияние на проницаемость иммуноглобулина G (IgG), тогда как четыре двойных слоя значительно снижали диффузию иммуноглобулина. Снижение проницаемости было объяснено сложной структурой полиэлектролитных пар. Кроме того, было обнаружено, что конечная проницаемость зависит от начальной пористости непокрытых альгинатных капсул (Gåserød, 1999). Проницаемость микрокапсул на основе олигохитозана и альгината и их стабильность оценивалась и в исследовании (Bartkowiak and Hunkeler, 2000). В своей работе исследователи пришли к выводу что молярная масса полианиона влияет на механическое сопротивление капсулы, но не на ее способность удерживать инкапсулированный белок, однако снижение проницаемости может быть достигнуто путем повышения концентрации полианиона (Bartkowiak, Hunkeler, 2000).

Диагностические системы. Разработка методов и приборов для проведения анализов биологических жидкостей является актуальной задачей современной медицинской диагностики. С развитием современной биотехнологии, в качестве одного из компонентов диагностических систем все чаще применяются дорогие рекомбинантные ферменты, как правило расходуемые в процессе анализа. Применение микроконтейнеров дает возможность проведения ферментативных реакций без затрат фермента. Благодаря микрокапсулам становится возможным не только защита ферментов, но и их извлечение из реакционной среды для повторного использования.

На основе полиэлектролитных микрокапсул собранных из полиаллиламина и полистиролсульфоната создана система многократного применения для анализа мочевины (Дубровский и др., 2017). В работе продемонстрировано, что инкапсулированная уреза сохраняет свою активность внутри не биоразлагаемых капсул и после проведения анализа может быть извлечена и использована повторно. Благодаря полупроницаемости полиэлектролитной оболочки сохраняется доступность фермента для молекул мочевины, при этом оболочка не пропускает к уреазе протеолитические ферменты, благодаря чему появляется возможность исследовать биологические жидкости без их предварительного фракционирования (Дубровский и др., 2017). В более поздних исследованиях, аналогичные микрокапсулы было предложено закрепить на рН-чувствительном электроде, для создания прибора способного многократно оценивать концентрацию мочевины в крови и моче (Фомкина, Ибадуллаева, 2018) и на рН чувствительном полевом транзисторе для анализа молока (Решетилов и др., 2015). Показано, что на основе этих микрокапсул возможно создание пластин обладающих ферментной активностью и в перспективе способных нести разнообразный набор ферментов (Tikhonenko et al., 2021). Применение аналогичных микрокапсул содержащих кристаллы каталазы и состоящих из пар полиэлектролитов ПАА/ПСС было так же

продемонстрировано в биосенсорах для определения концентрации перекиси водорода (Yu, Caruso, 2003).

Успехи достигнуты и при создании глюкоза чувствительных сенсоров, на основе инкапсулированной глюкозооксидазы в работе ДеГиста с коллегами (Bruno G. De Geest et al., 2006), а в другом исследовании продемонстрировано что микрокапсулы с этим ферментом, закрепленные на электроде по средствам берлинской лазури, демонстрируют результаты не отличимые от стандартных наборов, основанных на свободных ферментах, что подразумевает возможное применение изготовленных биосенсоров для анализа пищевых продуктов (Plekhanova et al., 2019).

Полиэлектролитные микрокапсулы могут выступать в качестве микроконтейнера несущего рН-чувствительную флуоресцентную метку. Так в работе Крефт с соавторами (Kreft et al., 2007), в микроконтейнеры был включен рН-чувствительный SNARF-1. Исследуя клетки рака молочной железы человека, и фибробласты, исследователи смогли проследить за изменением рН локальной среды капсул, во время перехода от щелочной клеточной среды к кислым лизосомальным компартментам. В дальнейшем, в капсулы содержащие SNARF-1, на равне с ним был инкапсулирован фермент уреза. Полученный таким образом микроконтейнер представлял собой диагностическую систему регистрирующую колебания концентрации мочевины в растворе (Kazakova et al., 2011). В дальнейшем были созданы микрокапсулы несущие сразу несколько чувствительных красителей: два рН-чувствительных красителя (флуоресцеин и орегонский зеленый) и один рН-нечувствительный краситель (родамин В)(Song et al., 2014).

Благодаря свойствам полиэлектролитов, в качестве систем диагностики возможно применение незаполненных микрокапсул. Дубровским с соавторами (Dubrovskii et al., 2019) разработан метод определения локализации зарядов на твердой поверхности. В работе применялись флуоресцентно меченые микрокапсулы с положительным и отрицательным поверхностным зарядом. С их помощью удалось определить локальные

заряды на поверхности образцов титана и слюды, что может быть использовано при поиске локальных дефектов медицинских протезов (Dubrovskii et al., 2019). В работе Кима с коллегами (Kim et al., 2022) изучалось разрушение микрокапсул под действием поверхностно активного вещества содиум додецилсульфат (СДС). Исследователями показано, что скорость разрушения и количество разрушившихся микрокапсул зависит от концентрации СДС в растворе, благодаря чему было предложено использовать микрокапсулы ПСС/ПАА для качественного и количественного обнаружения СДС в среде.

Таким образом, имеющиеся в настоящее время данные свидетельствуют о чрезвычайно широком спектре возможного применения полиэлектролитных микрокапсул в медицине и биотехнологии. Однако для использования ПМК в качестве микроконтейнеров и поиска новых областей их применения необходимым остается дальнейшее изучение физико-химических свойств полиэлектролитных микрокапсул и разработка новых технологий их контролируемого разрушения.

4. Материалы и методы

Материалы и реактивы

Поли(стиролсульфонат) натрия, 70 кДа, «Aldrich» (Германия); Поли(аллиламин гидрохлорид) 70 кДа, «Aldrich» (Германия); Бычий сывороточный альбумин (БСА) «Sigma» (Германия); Флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ) «Sigma» (Германия); ФИТЦ-Декстран 150кДа «Sigma» (Германия); Хлорид натрия «Реахим» (Россия); Сульфат аммония «Реахим» (Россия); Карбонат натрия «Реахим» (Россия); Хлорид кальция ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) «Реахим» (Россия); *Bacillus subtilis* ВКМ В-501Т (Россия); Этилендиаминтетрауксусная кислота «Sigma» (Германия).

Получение микросферолитов CaCO_3 .

К интенсивно перемешиваемому на магнитной мешалке 0,33М водному раствору CaCl_2 добавлялся равный объем 0,33М водного раствора Na_2CO_3 . Перемешивание продолжалось 30 с, после чего образовавшаяся суспензия выдерживалась в течение 15 мин при комнатной температуре без перемешивания. Формирование микросферолитов CaCO_3 контролировалось с помощью светового микроскопа. Надосадочная жидкость декантировалась, осадок промывался водой и использовался для получения полиэлектролитных микрокапсул. Полученные микрочастицы имели диаметр 5 ± 1 мкм. Количество образованных микросферолитов определялось в камере Горяева.

Получение составных микросферолитов методом копреципитации.

Составные микросферолиты получали аналогично тому, как описано выше в разделе получения простых микросферолитов CaCO_3 , но в присутствии белка/амиодарона/бактериальных спор – методом биоминерализации. Методика получения сводилась к следующему: к 0,33М раствору CaCl_2 , содержащему требуемое вещество и интенсивно

перемешиваемому на магнитной мешалке, быстро добавляли равный объем 0,33 М раствора Na_2CO_3 . Перемешивание продолжалось в течение 30 сек, после чего прекращалось, а образовавшаяся суспензия выдерживалась до полного осаждения образовавшихся частиц. Процесс «созревания» микросферолитов контролировали с помощью светового микроскопа. Затем надосадочную жидкость декантировали, осадок промывали водой и использовали для получения ПМК. Количество образованных микросферолитов определялось в камере Горяева. Полученные микрочастицы имели диаметр 5 ± 1 мкм.

Содержание инкапсулированного белка/амиодарона определялось спектрофотометрически, при определении высоты пика в среде приготовления до и после образования сферолитов.

Приготовление полиэлектrolитных микрокапсул.

Полиэлектrolитные микрокапсулы изготавливались методом поочередной адсорбции противоположно заряженных полиэлектrolитов на CaCO_3 микросферолит с его последующим растворением. Поочередную адсорбцию ПСС и ПАА на поверхности микросферолитов проводили в растворах полиэлектrolитов с концентрацией 2 мг/мл, содержащих 0,5М раствор NaCl . За каждым шагом адсорбции следовала тоекратная промывка раствором 0,5М NaCl , необходимая для удаления не адсорбированных молекул полимеров. Частицы отделялись от супернатанта центрифугированием при 500g. После нанесения требуемого числа слоев карбонатные ядра растворялись в 0,2М растворе ЭДТА в течение 2 часов. Полученные капсулы были тоекратно отмыты бидистиллированной водой для удаления продуктов распада ядер. Все стадии получения полиэлектrolитных микрокапсул проводились при температуре 20°C. Полученные микрокапсулы имели диаметр 5 ± 1 мкм.

Загрузка полиэлектролитных микрокапсул веществом методом сорбции

Предварительно приготовленные микрокапсулы с требуемым числом слоев инкубировали в растворе белка ФИТЦ-БСА с концентрацией бмг/мл в течение 12 часов. Полученные микрокапсулы трижды промывали дистиллированной водой для удаления неадсорбированных молекул вещества. Регистрацию результатов включения производили путём сравнения флуоресценции раствора до и после инкубации микрокапсул.

Получение флуоресцентно меченых ПАА и БСА

К раствору полиэлектролита или белка (10 мг/мл) в 50 мМ боратном буфере, рН 9,0 при перемешивании (300–400 об/мин) медленно прикапывали ФИТЦ в том же буфере. Компоненты сливали в мольном соотношении ФИТЦ:ПАА (БСА) (по аминокруппам)=1:100. После 1,5–2 часов инкубации полученный раствор диализовали против воды (10 литров) в течение суток

Определение содержания полиэлектролита в микрокапсуле

Определение содержания ПАА в микрокапсулах проводили спектрофотометрически по методу Бредфорд (Bradford, 1976). 10⁶ штук полиэлектролитных микрокапсул с определённым числом слоев разрушали при рН 9, далее раствор окрашивали с помощью реактива Бредфорд и определяли оптическую плотность раствора на длине волны 595 нм. Для определения концентрации ПАА в растворе строили калибровочную кривую, используя известные концентрации окрашенного ПАА, с помощью которой вычисляли концентрацию полимера в растворе разрушенных микрокапсул. Количество полимера на 1 слой определяли путём деления полученной величины на количество разрушенных микрокапсул и на число слоев ПАА в микрокапсуле.

Регистрация десорбции оболочки и выхода белка

Изучение десорбции оболочки микрокапсул и выход белка из них проводили методом флуоресцентной спектроскопии. Полиэлектролитные микрокапсулы, в оболочку которых содержала ФИТЦ-меченый ПАА, или в которые был инкапсулирован ФИТЦ-меченый БСА, осаждали центрифугированием при 3000 оборотах в течение 1 мин. Далее измеряли флуоресценцию супернатанта. Спектры флуоресценции регистрировали на приборе Cary Eclipse (USA) в термостатируемой кювете с длиной оптического пути 1 см при возбуждении светом с длиной волны 490нм

Определение заряда ПМК

Заряд микрокапсул определяли с помощью прибора Zetasizer nano ZS (UK) и набора стандартных пластиковых одноразовых кювет для калибровки (DTS0012) и кювет для измерения дзета-потенциала и проводимости (DTS1060 или DTS1070). Измерения проводились в дистиллированной воде при + 25°C. Регистрируемый угол рассеяния лазерного излучения составляет 173°C. Время накопления корреляционной функции 15 циклов по 15 с. Число повторений измерений не менее 3. Аттенюатор устанавливается в диапазоне 8–11. Значение функции Генри составляет 1,5. Разность потенциалов, приложенная к электродам кюветы, составляет 70 мВ.

Выращивание бактериальных культур

Штамм вида *Bacillus subtilis* ВКМ Б-501Т. Культуру выращивали в аэробных условиях при 28°C на триптон-соевом бульоне в пробирках в течение 3 дней, после чего пробирки выдерживали при комнатной температуре до образования спор (не менее 90%). Для инкапсуляции спор готовили суспензию в дистиллированной воде плотностью 15×10^8 /мл по МакФарланду.

Измерение буферной ёмкости

Суспензию микрокапсул ($6,6 \times 10^9$ микрокапсул в 8 мл воды) титровали растворами кислот или оснований в диапазоне рН от 4 до 9. Титрование проводилось путём ручного измерения с помощью рН-метра Hanna рН 211. Кислоту или щёлочь (с концентрацией 0,001 М или 0,005 М) добавляли в раствор для изменения рН раствора на 0,02 или более. Буферную ёмкость в моль/л рассчитывали по уравнению (Richard et al., 2013):

$$\text{Буф. Ёмк.} = \frac{C_{\text{кис/щел}} \times V_{\text{кис/щел}}}{V_S (\text{pH}(i + 1) - \text{pH}(i - 1))}$$

$C_{\text{кис/щел}}$ – концентрация добавляемой HCl или NaOH

$V_{\text{кис/щел}}$ – объём добавляемой HCl или NaOH

V_S – объём раствора

i – номер повтора

Регистрация разрушения капсул спорами.

Проводили высев 100 и 200 мкл плотной суспензии инкапсулированных спор в 5 мл питательной среды 5.5 ИБФМ в пробирках, контролем служил высев в 5 мл стерильной дистиллированной воды. Пробирки инкубировали при 28°C в течение 3-х суток. Подтверждение разрушения капсул и роста культуры проводили методом световой микроскопии, с использованием фазово-контрастного устройства, препарата «раздавленная капля».

Выход ФИТЦ-декстрана из микрокапсул разрушенных при прорастании спор детектирован методом флуоресцентной спектроскопии, для этого суспензию осаждали центрифугированием при 15000 об/мин в течение 1 мин. Спектры флуоресценции регистрировались на приборе Infinite 200 Tecan при возбуждении светом с длиной волны 480 нм.

5. Результаты и обсуждение¹

5.1. Стабильность полиэлектролитных 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

¹Основные результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих научных статьях в рецензируемых журналах, индексируемых в наукометрических базах данных Web of Science и/или Scopus. В скобках приведен объем публикаций в печатных листах и вклад автора в печатных листах

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)**
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)**

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. В частности влияние присутствие солей на полиэлектролитные микрокапсулы описано в статьях Сухорукова (Sukhorukov et al., 1996) и Клитзинг (Klitzing and Möhwald, 1996). Влияние температуры на стабильность ПМК может проявляться за счет 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 3. 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) (рисунок 3А). 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) (рисунок 3Б). 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).

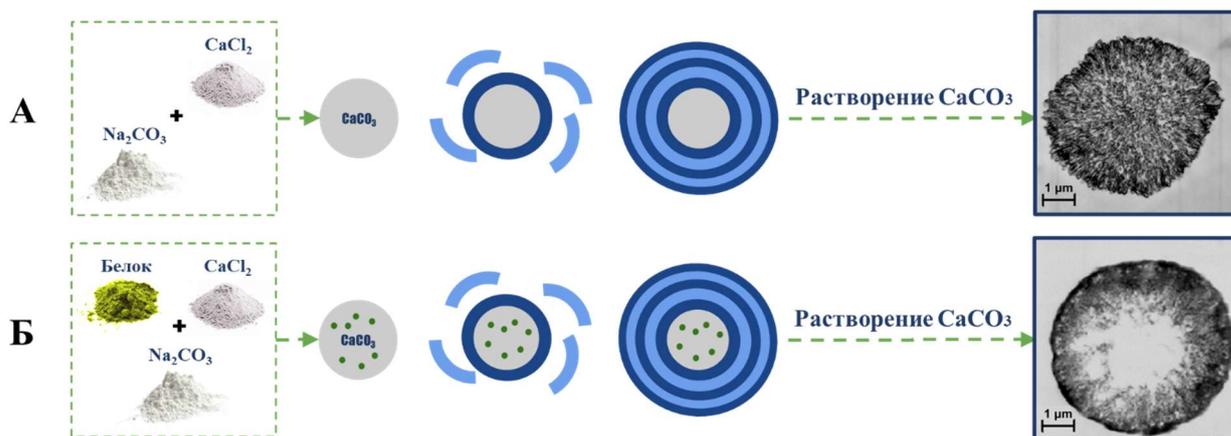


Рисунок 3. Схема приготовления полиэлектролитных микрокапсул А- формирование на CaCO_3 сферолите, Б- формирование на составном сферолите CaCO_3 -белок.

В работе исследовались полиэлектролитные микрокапсулы 2-х типов: полученных на CaCO_3 сферолите и на составном сферолите CaCO_3 -белок. Оба типа капсул получены на основе поликатиона полиаллиламина (ПАА) и полианиона полистиролсульфоната (ПСС).

На первом этапе работы, было определено содержание полимера, входящего в состав микрокапсул с различным числом слоев, а также произведен пересчет этих значений на один слой, результаты приведены в табл.1.

Таблица 1. Содержание полимера в полиэлектролитных микрокапсулах с различным числом слоев

Число слоев	m, мкг/капсулу	m, мкг/слой
6	8.1×10^{-6}	2.7×10^{-6}
8	10.7×10^{-6}	2.67×10^{-6}
10	$12,3 \times 10^{-6}$	2.46×10^{-6}

Далее, на основе данных о массе полиэлектролита, содержащегося в микрокапсулах, была рассчитана масса полимера содержащиеся в исследуемых образцах, составляющих 100 ± 10 млн штук микрокапсул. Таким

образом, общее количество меченого полиэлектrolита в пробе составляло около 270 мкг.

Для изучения стабильности микрокапсул измерялось количество полиэлектrolита, отслоившегося от внешней поверхности микрокапсул в различных условиях. Были исследованы полиэлектrolитные 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). Десорбция полимера оценивалась спектрофотометрически, по количеству ФИТЦ-ПАА, вышедшему в раствор инкубации. Капсулы инкубировались при температуре 5°C , 22°C и 37°C , в $0,2\text{M NaCl}$, 2M NaCl и $0,1\text{M (NH}_4)_2\text{SO}_4$. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ был выбран как соль содержащая противоионы обоих полиэлектrolитов для сравнения результатов с NaCl .

5.1.1. Стабильность микрокапсул, полученных на составном сферолите CaCO_3 -белок

Для изучения стабильности микрокапсул, полученных на составном сферолите CaCO_3 -белок, были приготовлены микрокапсулы состава (ПСС/ПАА)₃. В качестве инкапсулируемого белка, при создании ядра использовался бычий сывороточный альбумин (БСА). При исследовании десорбции полиэлектrolита за 100% принято суммарное количество ФИТЦ-ПАА в исследуемой пробе. Результаты исследования представлены на рисунке 4.

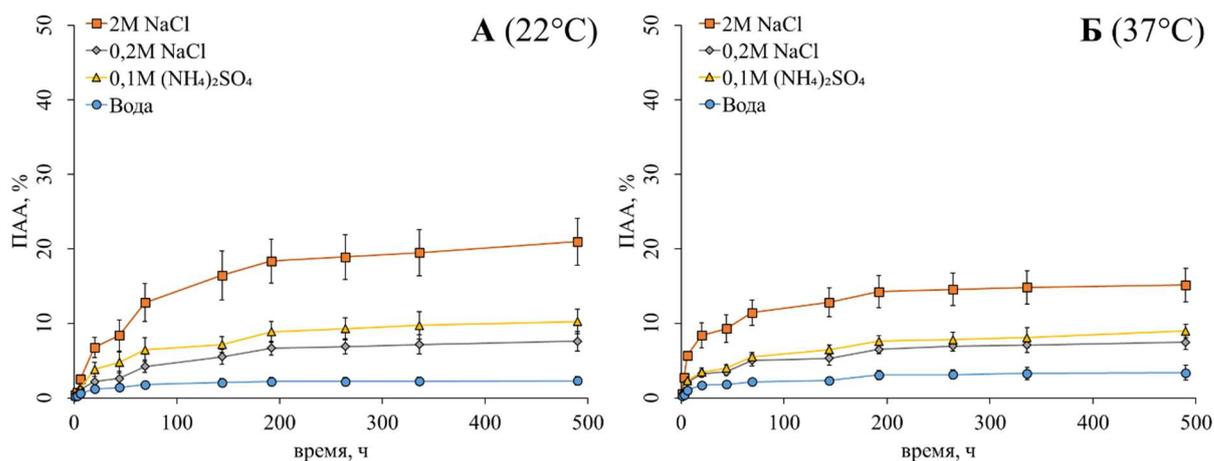


Рисунок 4. Зависимость количества ФИТЦ - ПАА в супернатанте от времени инкубации полиэлектролитных микрокапсул, полученных на составном сферолите CaCO_3 -белок, при комнатной температуре (22°C) (А) и при 37°C (Б), в присутствии солей.

Из рисунка видно, при инкубации микрокапсул в воде количество потерянного полиэлектролита составляет около 2%. Присутствие в растворе инкубации солей в разных концентрациях оказывает влияние на десорбцию полиэлектролитов. Количество полиэлектролита, вышедшего в среду, зависит от ионной силы раствора. При 22°C , в растворе 2М NaCl ($I=8$ моль/л), за 500 часов инкубации, от внешнего слоя отделилось около 20% полимера. Раствор этой же соли, но меньшей концентрации, вызывал меньшую десорбцию полимера, а значит, и меньшее разрушение микрокапсулы, так, при инкубации ПМК в 0,2М NaCl ($I=0,08$ моль/л), количество полимера, отделившегося от внешнего слоя, составило примерно 7%. Влияние ионной силы на стабильность ПМК может быть объяснено экранирующим действием ионов насульфо- и аминогруппы полиэлектролитов и тем самым приводить микрокапсулы к разрыхлению.

При сравнении влияния на стабильность микрокапсул хлорида натрия и сульфата аммония установлено, что 0,2М NaCl и 0,1 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ одинаковой ионной силы (0,08 моль/л) вызывают примерно равную, десорбцию полимера. Таким образом можно сделать вывод о том, что, если ионы и влияют на десорбцию полиэлектролитов, это связано не с конкурентным связыванием сульфогрупп соли с аминогруппами полиэлектролита, а с электростатической природой взаимодействия.

Количество полиэлектролита, потерянного микрокапсулами при 37°C меньше по сравнению с их инкубацией при 22°C. Это может быть объяснено тем, что при нагревании оболочка микрокапсул утолщается, количество несвязанных между собой участков полиэлектролитов в ней становится меньше, что приводит к увеличению её устойчивости (Dubrovskii et al., 2006). Исследования стабильности микрокапсул при 5°C показали, что микрокапсулы не разрушаются в присутствии ни одной из исследуемых солей, что связано с падением подвижности полиэлектролитных цепей при этой температуре.

Таким образом, в ходе работы, продемонстрировано влияние ионной силы и температуры на стабильность ПМК. Полученные данные свидетельствуют о высокой стабильности полиэлектролитных микрокапсул, полученных на составном сферолите CaCO₃-белок, при их хранении в воде и растворах слабой ионной силы.

5.1.2. Стабильность микрокапсул, полученных на CaCO₃ сферолите

Для изучения стабильности микрокапсул, полученных на мезопористом сферолите CaCO₃, были приготовлены микрокапсулы состава (ПАА/ПСС)₃ПАА. При исследовании десорбции полиэлектролита за 100% принято суммарное количество ФИТЦ-ПАА в исследуемой пробе. Результаты исследования представлены на рисунке 5.

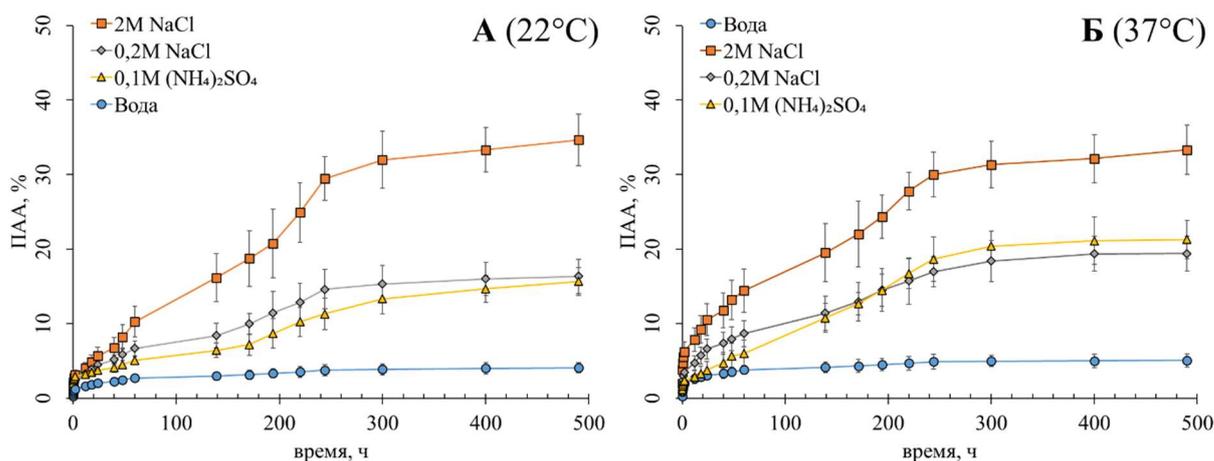


Рисунок 5. Зависимость концентрации ФИТЦ меченого ПАА в супернатанте от времени инкубации полиэлектролитных микрокапсул, полученных на сферолите CaCO_3 , при комнатной температуре (22°C) (А) и при 37°C (Б), в присутствии солей

Из рисунка видно, что при инкубации микрокапсул, полученных на сферолите CaCO_3 в воде, количество потерянного полиэлектролита составляет около 4%, что больше, чем у микрокапсул, полученных на составном сферолите за тоже время. Как и в предыдущем случае, присутствие солей оказывает влияние на десорбцию полиэлектролита. В растворе 2М NaCl ($I=8$ моль/л), за 500 часов инкубации, наблюдается потеря около 35% полимера внешнего слоя, что также больше, чем у микрокапсул, полученных на составном сферолите за тоже время. При этом, аналогичным образом, раствор меньшей концентрации, вызывал меньшую десорбцию полимера, так, при инкубации ПМК в 0,2 М NaCl ($I=0,08$ моль/л), количество полимера, отделившегося от внешнего слоя, составило примерно 16%. Влияние соли на микрокапсулы, полученные на сферолите CaCO_3 , как и в случае капсул, полученных на составном сферолите CaCO_3 -белок, объясняется экранирующим действием ионов на сульфо- и аминогруппы полиэлектролитов. Сравнение влияния растворов хлорида натрия и сульфата аммония одинаковых ионных сил, как и в случае выше, не выявило достоверно значимого различия.

Из рисунка 5 также видно, что в случае микрокапсул, полученных на сферолите CaCO_3 , температура не оказывает значимого влияния на стабильность. Это может быть связано с тем, что полиэлектролитные

микрокапсулы, полученные на сферолите CaCO_3 , заполнены интерполиэлектролитным комплексом и не имеют чётко выраженной оболочки, способной к перегруппировке и упорядочиванию при нагревании. Незначительное увеличение десорбции полимера при повышении температуры, может быть объяснено увеличением подвижности молекул полиэлектролита при увеличении температуры.

Таким образом, в ходе работы, установлено, что полиэлектролитные микрокапсулы, полученные на сферолите CaCO_3 , стабильны при инкубации в воде, но менее устойчивы к влиянию ионной силы раствора, чем капсулы, полученные на составном сферолите CaCO_3 -белок. Повышение температуры среды на стабильность таких микрокапсул влияния не оказывает.

5.2. Динамика высвобождения инкапсулированного белка

Для создания микроконтейнеров, на основе полиэлектролитных микрокапсул необходимым является исследование их способности удерживать инкапсулированные вещества. Как показано выше, температура инкубации и присутствие в растворе солей в различных концентрациях, оказывает влияние на электростатические связи в ПМК и стабильность микрокапсул, как следствие это влияние может приводить к увеличению высвобождения инкапсулированного вещества. Таким образом следующим этапом работы стало изучение динамики высвобождения инкапсулированного белка из микрокапсул, полученных составном сферолите CaCO_3 -белок и на CaCO_3 сферолите, при различных условиях.

5.2.1. Динамика высвобождения инкапсулированного белка из микрокапсул, полученных составном сферолите CaCO_3 -белок

Для исследования динамики высвобождения белка были приготовлены микрокапсулы состава (ПСС/ПАА)₃, в качестве белка, содержащегося в ядре при приготовлении, был выбран бычий сывороточный альбумин (БСА), меченный ФИТЦ. Содержание белка в одной пробе исследуемых микрокапсул равнялась примерно 1 мг. Регистрация вышедшего в среду белка

производилась после инкубации микрокапсул при температуре 22°C и 37°C, в присутствии NaCl, результаты исследования приведены на рисунке 6.

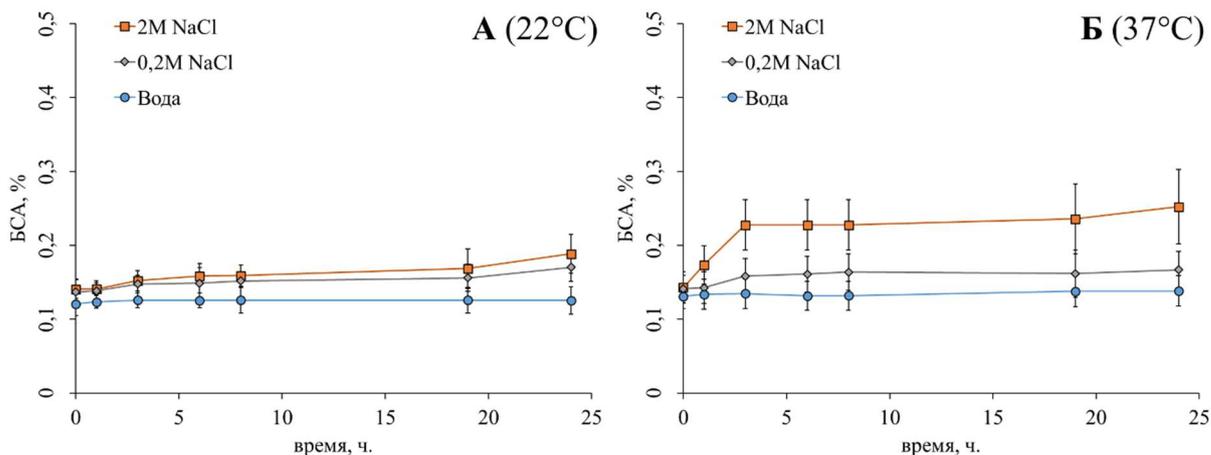


Рисунок 6. Зависимости высвобождения БСА в супернатанте от времени инкубации полиэлектролитных микрокапсул, полученных на составном сферолите CaCO₃-белок в присутствии солей, при 22° С (А) и при 37°С (Б)

Из рисунка видно, что выход белка из микрокапсул наблюдается в первые минуты инкубации и практически не происходит в дальнейшем, при этом количество вышедшего белка не превышает 0,3% от его содержания. Это позволяет сделать вывод, что белок не высвобождается из микрокапсул этого типа. Однако, на рисунке 6(Б) видно, что в присутствии 2 М хлорида натрия, при 37°C, количество ФИТЦ-БСА в растворе немного выше, чем в аналогичных условиях при комнатной температуре. Причиной этого может быть в том, что в условиях повышенной ионной силы небольшое количества белка, связанное непосредственно с оболочкой, высвобождается при её уплотнении от температуры.

Таким образом, в ходе работы, продемонстрирована высокая способность капсул, полученных составном сферолите CaCO₃-белок к удержанию инкапсулированного белка, во всех изученных условиях.

5.2.2. Динамика высвобождения инкапсулированного белка из микрокапсул, полученных CaCO₃ сферолите

Для изучения выхода белка из капсул, полученных на сферолите CaCO₃, были приготовлены микрокапсулы состава (ПАА/ПСС)₃ПАА, загруженные

белком после приготовления, методом сорбции (Kochetkova et al., 2013). В качестве белка для инкапсуляции был выбран бычий сывороточный альбумин (БСА), меченный ФИТЦ. Содержание белка в одной пробе исследуемых микрокапсул равняется примерно 1 мг. Регистрация вышедшего белка производилась после инкубации микрокапсул при температуре 22°C и 37°C, в присутствии NaCl, результаты исследования приведены на рисунке 7.

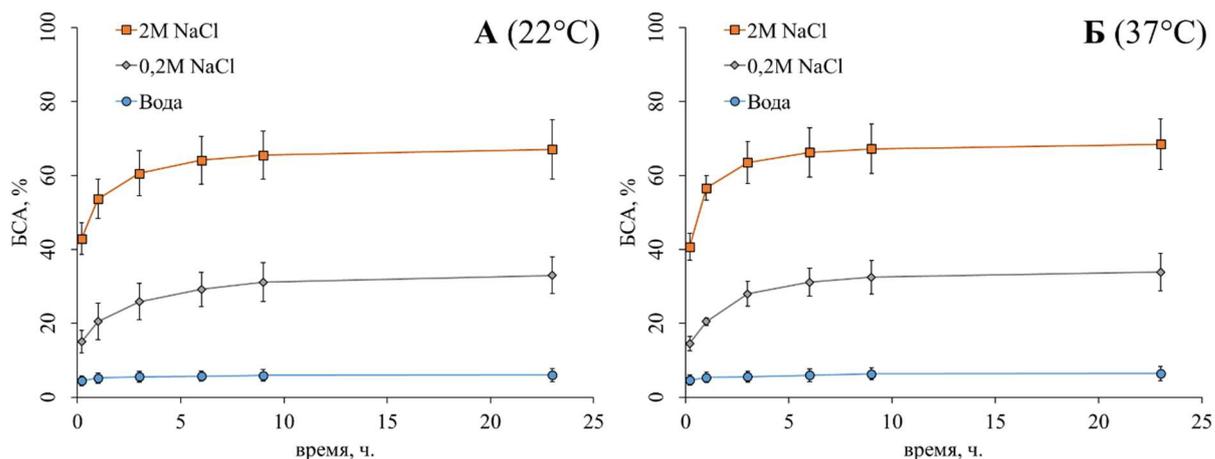


Рисунок 7. Зависимость высвобождения БСА в супернатанте от времени инкубации полиэлектролитных микрокапсул, полученных на сферолите CaCO_3 в присутствии солей, при 22° С (А) и при 37°С (Б)

Как видно из рисунка, в случае микрокапсул, полученных сферолите CaCO_3 и загруженных белком после приготовления, высвобождение белка в воду не превышает 7%, однако присутствие солей влияет на способность микрокапсул удерживать инкапсулированный белок. В присутствии 2М NaCl количество ФИТЦ-БСА в растворе увеличивалось в течение первых 10 часов с дальнейшим выходом на плато и составило до 70% от общего содержания белка. Количество высвободившегося белка увеличивается с увеличением ионной силы раствора. При инкубации микрокапсул в 0,2 М NaCl, вышедший белок составил 33% от инкапсулированного. Данный результат позволяет говорить о преимущественно электростатическом характере удержания белка в микрокапсулах этого типа. Таким образом увеличение ионной силы раствора, приводит не только к уменьшению полиэлектролит-полиэлектролитных взаимодействий (что подтверждается данными по увеличению десорбции), но и к экранированию ионами молекул белка от

полиэлектролита. Остановка высвобождения белка может быть связана со стабилизацией структуры ПМК 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, что, как и в случае изучения их стабильности может быть объяснено отсутствием сформированной внешней оболочки способной к уплотнению.

В ходе работы, показано, что полиэлектролитные микрокапсулы, полученные на сферолите CaCO_3 , могут удерживать белок при хранении в воде, но высвобождают его при увеличении ионной силы раствора, независимо от температуры. Это свойство позволяет рассматривать их в качестве перспективной системы для пролонгированного высвобождения инкапсулированного вещества. Такая система может быть актуальна в случаях, когда требуется длительное поддержание концентрации лекарственного препарата в организме пациента.

5.3. 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. Результаты исследования приведены в табл. 2.

Таблица 2. Результаты исследования поверхностного заряда полиэлектролитных микрокапсул

Формула капсулы	Тип капсулы		
	с CaCO_3 ядром	полученные на сферолите CaCO_3	полученные на составном сферолите CaCO_3 -белок
$(\text{ПАА/ПСС})_3$	- 20 мВ	+ 25 мВ	+ 22 мВ
$(\text{ПАА/ПСС})_3\text{ПАА}$	+ 24 мВ	+ 23 мВ	+ 20 мВ

Из таблицы видно, что поверхностный заряд ПМК не зависит от заряда полимера, образующего внешний слой капсулы, во всех случаях, кроме капсул с не удалённым CaCO_3 ядром. В работе Володькина (Volodkin et al., 2004) было выдвинуто предположение, что во время растворения ядра увеличивается осмотическое давление за счёт быстрого течения ионов Ca^{2+} и CO_3^{2-} из внутренней части ядра в окружающий раствор. Этот процесс мог повлиять на структуру и свойства полиэлектролитного комплекса, и привести к перегруппировке полимеров. В связи с этим была выдвинута гипотеза о том, что в процессе приготовления ПМК, при разрушении кальциевой основы ЭДТА, происходит перемешивание и перегруппировка полиэлектролитных слоёв микрокапсулы.

Для проверки этой гипотезы был проведён эксперимент оценивающий выход из микрокапсул полиэлектролита разных слоев. В качестве объекта исследования были использованы микрокапсулы 3х типов: полученные на составном сферолите CaCO_3 -белок, полученные на сферолите CaCO_3 и микрокапсулы содержащие CaCO_3 . Приготовленные ПМК имели ФИТЦ- ПАА одним из своих слоев: 1м, 3м, 5м или 7м слоем.

Исходя из того, что полимер десорбируется только с поверхности микрокапсул, можно предположить, что в случае, если перемешивание полиэлектролитных слоёв не происходит, будет обнаружена десорбция только верхнего слоя капсул. Если при инкубации будет наблюдаться выход в раствор нижних полиэлектролитных слоёв, это будет свидетельствовать о том, что произошла перегруппировка полиэлектролита и слои смешались.

Как уже было показано выше, десорбция ПМК зависит от ионной силы раствора, в связи с электростатической природой межполиэлектролитных связей. Таким образом, при инкубации полиэлектролитных микрокапсул в растворе 2М NaCl будет наблюдаться более выраженный выход полиэлектролита в раствор. Результаты исследования капсул представлены на рисунке 8, за 100% принят уровень отслаивания 7-го слоя соответствующего типа капсулы.

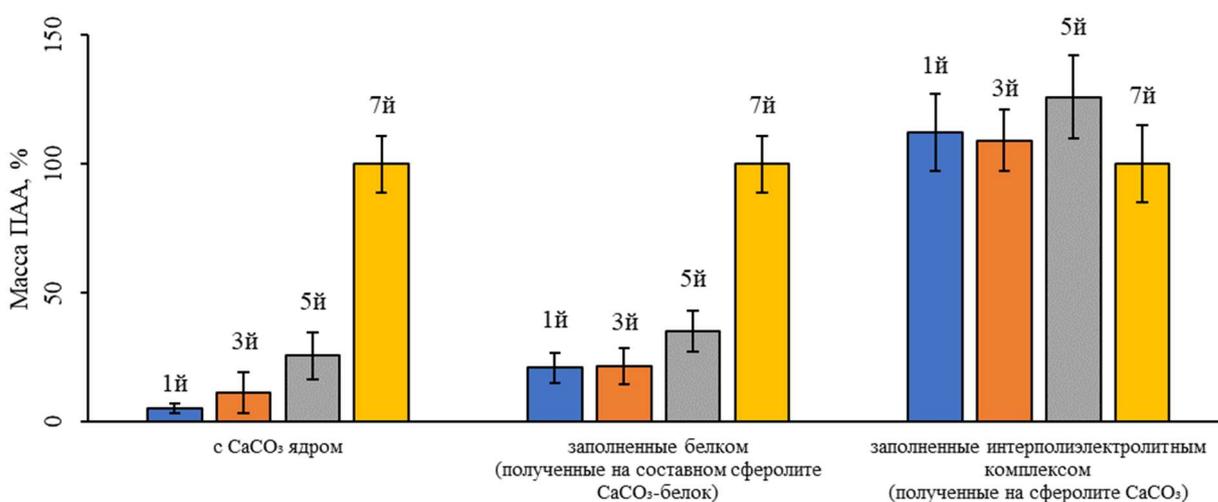


Рисунок 8. Выход полиэлектролита разных слоёв различных ПМК в 2М NaCl при 22°C

Как видно из рисунка, в случае ПМК с CaCO₃ ядром, наиболее выражена десорбция внешнего слоя (7-го). Можно сделать вывод, что в случае присутствия карбонатного ядра внутри полиэлектролитной микрокапсулы, нижние слои полиэлектролитов зафиксированы, таким образом подвижность полиэлектролитов зависит от глубины залегания и ослабевает от первого слоя к седьмому.

В случае микрокапсул, полученных на составном сферолите CaCO_3 -белок, наиболее выраженная десорбция ПАА происходит с 7 слоя микрокапсулы, однако наблюдается также возросший выход 1, 3 и 5 меченых слоев. Можно сделать вывод, что в случае растворения ядра, содержащего белок, происходит частичное перемешивание полиэлектролитных слоев. Это может быть связано с тем, что содержащие белок микрокапсулы, при 7 слоях имеют сформированную внешнюю оболочку (Kazakova et al.), которая препятствует полному перемешиванию полиэлектролитных слоев.

Микрокапсулы, приготовленные на CaCO_3 сферолите демонстрируют примерно равную степень присутствия всех слоев в растворе инкубации, что свидетельствует о том, что при разрушении ядра происходит перемешивание полиэлектролитных слоев. Таким образом, сравнивая полученный результат с капсулами, содержащими CaCO_3 ядро, можно сделать вывод, что удаление ядра приводит к нарушению структуры оболочки и перемешиванию полиэлектролитных слоёв между собой.

Используя эти данные, можно сделать заключение, что у микрокапсул, заполненных белком, происходит частичное перемешивание полиэлектролитов, что может быть связано с тем, что содержащие белок микрокапсулы при 7 слоях имеют сформированную внешнюю оболочку, которая препятствует полному перемешиванию. Микрокапсулы, приготовленные на CaCO_3 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. Графическая модель структуры изученных капсул, составленная на основе полученных данных, представлена на рисунке 9.

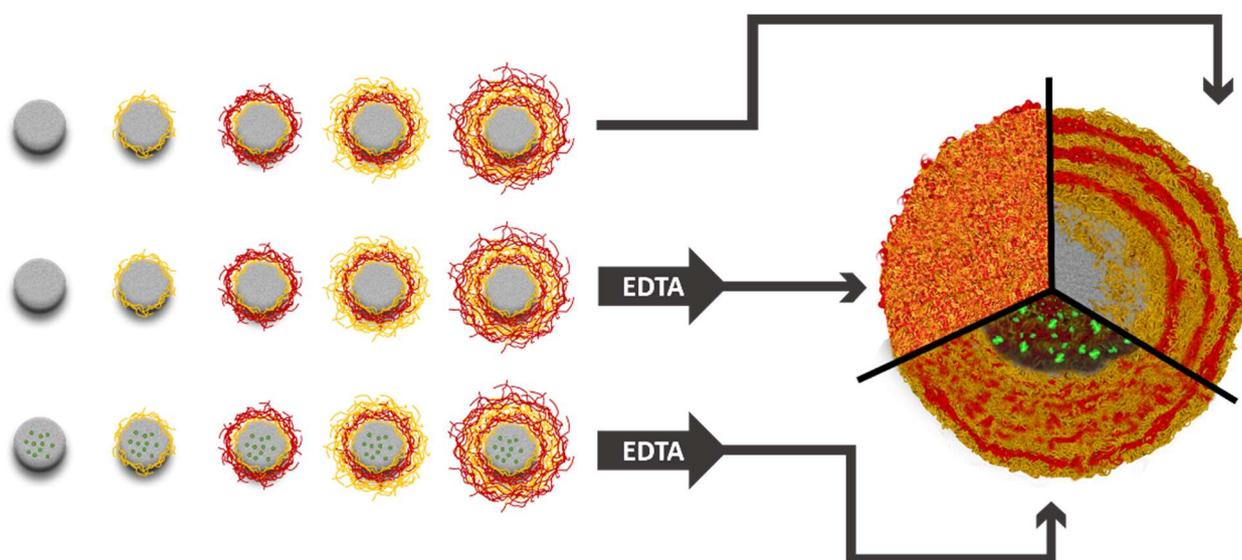


Рисунок 9. Графическая модель структуры ПМК

5.4. Буферные свойства полиэлектролитных микрокапсул

Буферная емкость 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). В составе полиэлектролитного комплекса буферная ёмкость преимущественно зависит от буферной ёмкости слабого полиэлектролита (Chavasit et al., 1988), однако, различное химическое окружение и стерические свойства полиэлектролита приводят к диапазону различных значений pK_a для одного и того же мономера в разных положениях полиэлектролита (Richard et al., 2013). Данные о влиянии полиэлектролитов входящих в состав супрамолекулярных структур на буферную емкость можно использовать для защиты металлических поверхности от коррозии (Zheludkevich et al., 2007; Skorb et al., 2009; Andreeva et al., 2010), защиты органических молекул от pH-опосредованной деградации (Andreeva et al., 2017), это же свойство необходимо учитывать при создании pH-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. Результаты эксперимента представлены на рисунке 10.

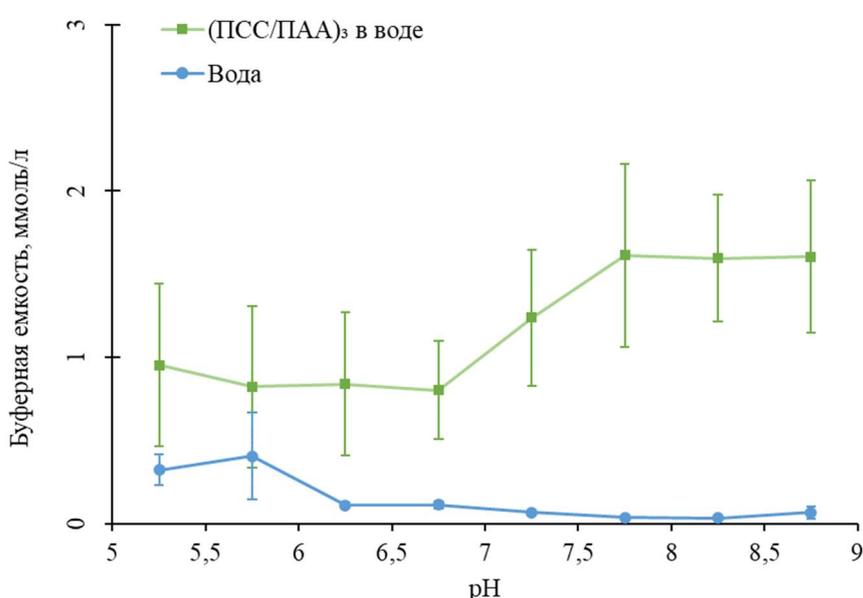


Рисунок 10. Буферная ёмкость суспензии $6,6 \times 10^9$ штук микрокапсул (ПСС/ПАА)₃ и воды

Из рисунка видно, что микрокапсулы обладают буферной ёмкостью. Микрокапсулы представляют собой супрамолекулярные системы, состоящую из полиэлектролитов, связанных между собой электростатически, при этом в ПМК так же могут оставаться и участки полимеров, не задействованных в этой связи. Таким образом была выдвинута гипотеза, что основной вклад в буферную ёмкость ПМК, вносят участки свободного ПАА, способные к (де)протонированию.

Для подтверждения гипотезы было проведено исследование буферной ёмкости суспензии микрокапсул при повышении ионной силы раствора.

Влияние ионной силы раствора на стабильность микрокапсул и их способность удерживать инкапсулированный белок было продемонстрировано выше. Присутствие в растворе ионов может приводить к экранированию заряженных групп полиэлектролита, ослабляя тем самым полиэлектролит-полиэлектролитную связь, а следовательно, повышать доступность групп ПАА.

Для подтверждения гипотезы были изучены буферные ёмкости суспензий $6,6 \times 10^9$ штук микрокапсул при 0,2, 1 и 3М NaCl (рисунок 11).

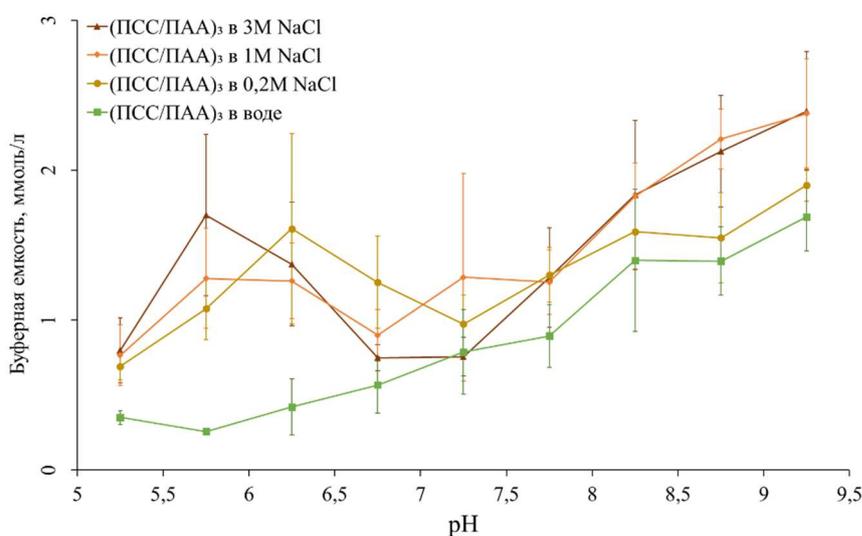


Рисунок 11. Буферная ёмкость суспензии $6,6 \times 10^9$ штук микрокапсул (ПСС/ПАА)₃ в воде и 0,2 М, 1 М и 3 М NaCl

Как видно из рисунка, присутствие NaCl в растворе приводит к увеличению буферной ёмкости ПМК. 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.

Одной из возможных причин изменения буферной ёмкости полиэлектролитных микрокапсул под действием ионной силы раствора

является изменение физико-химических свойств полиэлектролитов. Так, в работах (Singh et al., 2015; Curtis et al., 2016; Gallops et al., 2019) показано, что добавление 10-150 мМ NaCl в раствор полиэтиленимина приводит к уменьшению электростатического отталкивания между заряженными группами мономеров полиэлектролита из-за чего ослабевают гидрофобные и водородные внутримолекулярные взаимодействия, что увеличивает растворимость и гидродинамический радиус полимера. В результате описанный выше эффект приводит к увеличению количества аминокрупп полиэлектролита, способных к протонированию/депротонированию.

Другой причиной изменения буферной ёмкости полиэлектролитных микрокапсул под действием ионной силы может быть изменение растворимости полиэлектролитного комплекса (ПК) (Cundall et al., 1979; Marciel et al., 2018; Saikaew et al., 2019). В работе (Marciel et al., 2018) показано, что при концентрации NaCl < 0,3М уменьшается количество скомпенсированных участков полиэлектролитного комплекса поли(Lлизин)/поли(L-глутаминовая кислота), с сохранением его целостности. При этом полиэлектролитный комплекс обладал физико-химическими свойствами (эффективная длина Куна, корреляционная длина эpsilon и бетта), более близкими к индивидуальным растворам полиэлектролитов и, как следствие, обладал более высокой растворимостью, чем комплекс в воде.

5.4.1. Влияние температуры на буферную ёмкость микрокапсул

В работах (Zhang et al., 2018; Ali et al., 2019; Neitzel et al., 2021) показано, что повышение температуры инкубации приводит к уменьшению вклада воды в свободный объем полиэлектролитов находящихся в комплексе, увеличению ионного взаимодействия между их цепями и уменьшению скольжения цепей относительно друг друга, в результате чего растворимость полиэлектролитного комплекса значительно снижается и уменьшается количество групп способных к (де)протонированию. При этом, в работе (Dubrovskii et al., 2006) показано что, при нагревании полиэлектролитные

микрокапсулы сжимаются, а их оболочка уплотняется. Таким образом, можно предположить снижение буферной ёмкости у предварительно прогретых микрокапсул. В связи с этим, следующим этапом работы стало изучение влияния температуры на буферную ёмкость микрокапсул.

Для изучения влияния температуры была изучена буферная ёмкость ПМК, после их 60 минутной инкубации при температурах 60 и 90°C. На рисунке 12 представлены кривые зависимости буферной ёмкости капсул (ПСС/ПАА)₃ от рН при различных температурах предварительного прогрева.

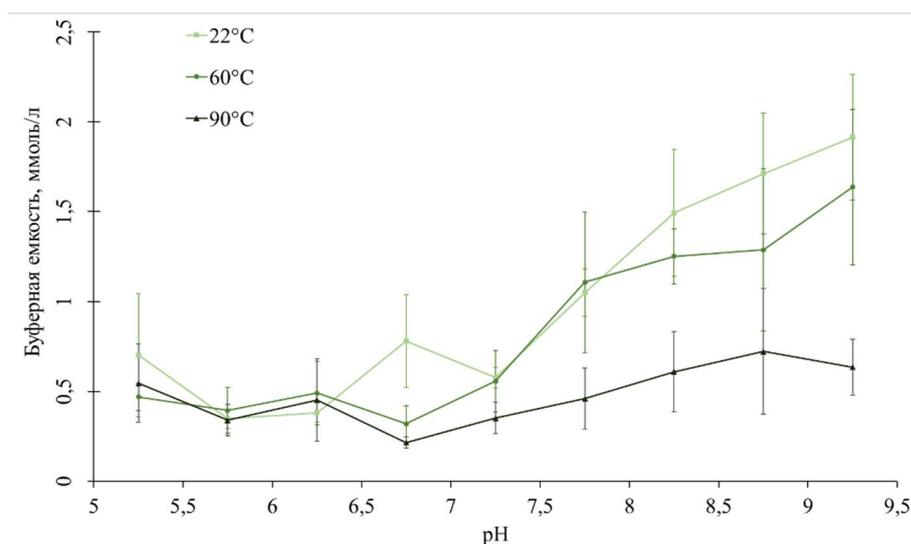


Рисунок 12. Буферная ёмкость суспензии $6,6 \times 10^9$ штук микрокапсул (ПСС/ПАА)₃, после их инкубации при 24°C, 60°C и 90°C.

Как видно из рисунка, буферная ёмкость в щелочном диапазоне рН падает при росте температуры прогрева микрокапсул. Это связано с тем, что при более высоких температурах прогрева ПМК сильнее сжимаются и уплотняются, и, как следствие в них снижается количество свободного ПАА.

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. Результаты данного исследования приведены на рисунке 13.

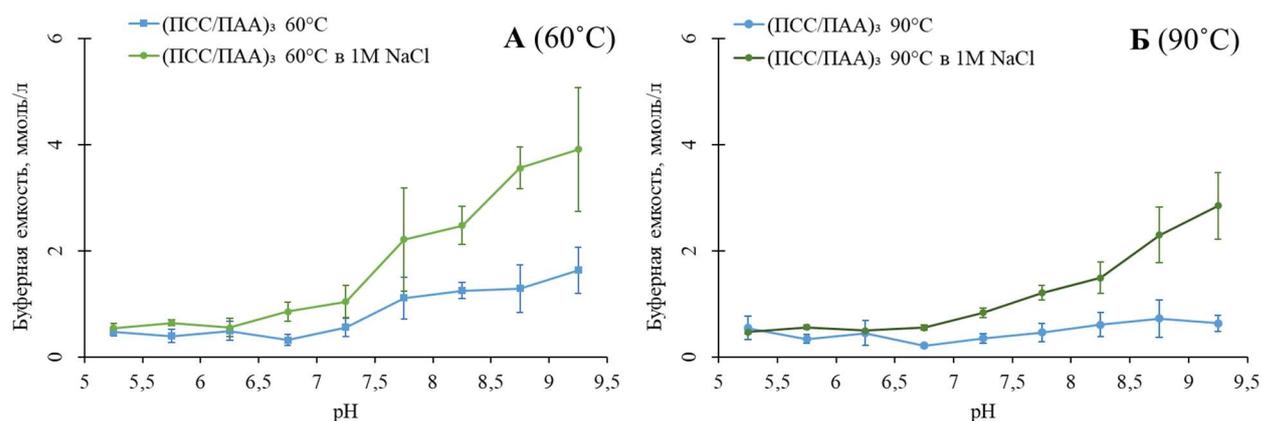


Рисунок 13. Буферная ёмкость суспензии $6,6 \times 10^9$ штук микрокапсул (PSS/PAA)₃ в воде и в растворе 1M NaCl после инкубации при 60°C (А) и 90°C (Б)

Как видно из рисунка, добавление соли к предварительно прогретым микрокапсулам приводит к росту буферной ёмкости, что объясняется тем, что повышение ионной силы раствора привело к ослаблению связей между ПАА и PSS, которые были скомпенсированы прогревом. Таким образом нагревание ПМК можно рассматривать как процесс, противоположный добавлению соли к суспензии капсул.

5.4.2. Влияние количества микрокапсул и полиэлектролитных слоев на буферную ёмкость

Количество полиэлектролитных микрокапсул также может оказывать влияние на их буферную ёмкость. Так, в работе Киюн Тан и Алан Р. Дентон обнаружено, что изменение количества микрокапсул приводит к нелинейному сдвигу pH, который связан с нелинейным изменением плотности ионов внутри полостей ПМК (Tang and Denton, 2014). Кроме того, по мере увеличения объемной доли частиц возникает так называемый эффект “кластеризации” (Kanelloroulos 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 and Huber, 2014), в свою очередь, это

может изменить локальную концентрацию $[H^+]$ и буферную ёмкость всей системы.

Для изучения влияния количества ПМК на буферную ёмкость использовались микрокапсулы (ПСС/ПАА)₃ с титрами: $3,4 \times 10^9$ микрокапсул, $6,6 \times 10^9$ микрокапсул и $13,1 \times 10^9$ микрокапсул. Результаты этого исследования представлены на рисунке 14.

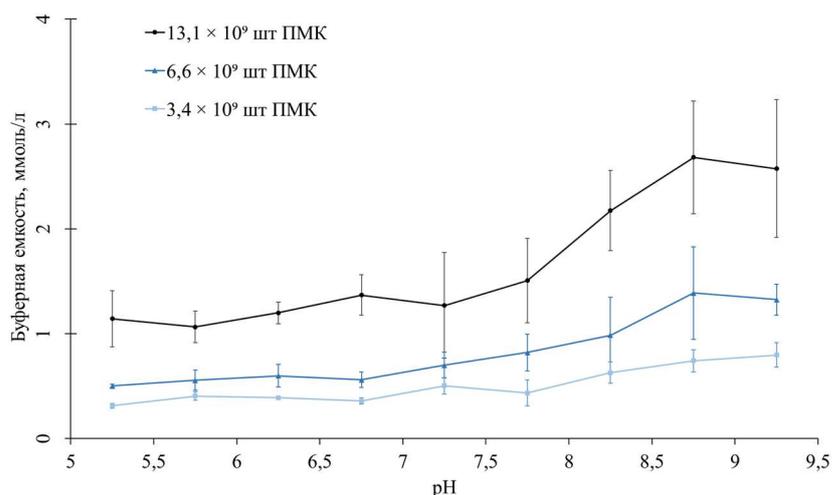


Рисунок 14. Буферная ёмкость суспензии $6,6 \times 10^9$ штук (ПСС/ПАА)₃ в зависимости от количества микрокапсул

Как видно из рисунка, в диапазоне pH от 5,5 до 9 показано пропорциональное увеличение буферной ёмкости от количества ПМК, что связано с увеличением количества ПАА в системе.

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 and 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 pH.

Ещё одним подтверждением возможного влияния количества слоев оболочки микрокапсулы на буферную ёмкость является изменение её электропроводности. В работе Тао Сун с соавторами (Sun et al., 2010) было показано, что проводимость микрокапсул (ПАА/ПСС)₆ и (ПАА/ПСС)₉ отличаются друг от друга. В свою очередь, электропроводность полиэлектролитного комплекса оболочки ПМК зависит от плотности ионогенных групп и ионных и неионных внутри- и межмолекулярных взаимодействий отдельных мономеров, которые зависят от уровня протонирования и сольватации полиионов (Bordi et al., 2002). Таким образом, буферная ёмкость ПМК может варьироваться в зависимости от количества слоев ПМК, поскольку буферная ёмкость полиэлектролитов и их комплексов зависят от тех же параметров, что и электропроводность полиэлектролитов (Singh et al., 2015; Ali et al., 2019; Gallops et al., 2019; Saikaew et al., 2019).

Таким образом, следующим этапом работы стало изучение влияния состава оболочки, на буферную ёмкость микрокапсул. Были исследованы капсулы состава (ПСС/ПАА)₃ и (ПСС/ПАА)₃ПСС, результаты приведены на рисунке 15.

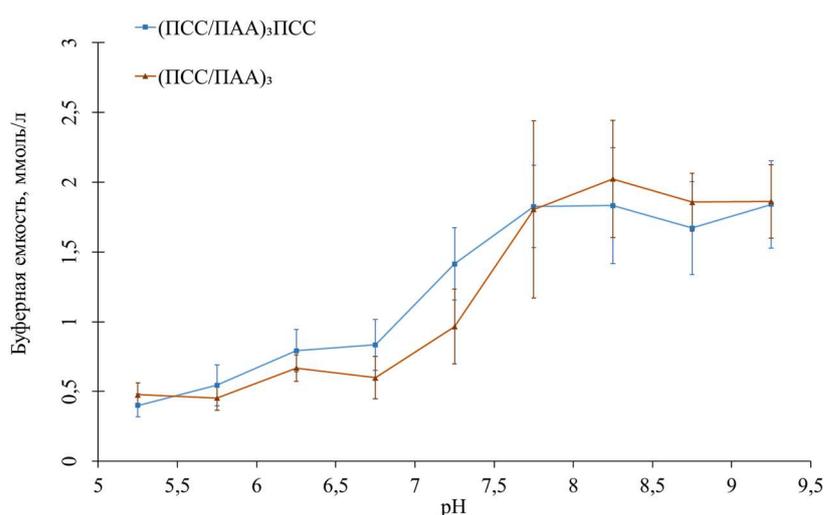


Рисунок 15. Буферная ёмкость суспензии $6,6 \times 10^9$ штук (ПСС/ПАА)₃ и (ПСС/ПАА)₃ПСС

Из рисунка, видно, что наличие дополнительного слоя ПСС не повлияло на буферную ёмкость капсул. Этот эффект может быть обусловлен тем, что за буферную ёмкость отвечает весь объем ПАА микрокапсулы, а не её

поверхность. Таким образом, если приведённое выше предположение верно, то увеличенное количество слоев ПАА увеличит ёмкость буфера. Чтобы подтвердить эту гипотезу, были измерены буферные ёмкости суспензий микрокапсул (ПСС/ПАА)₃ (ПСС/ПАА)₅ (ПСС/ПАА)₇. Полученные результаты приведены на рисунке 16.

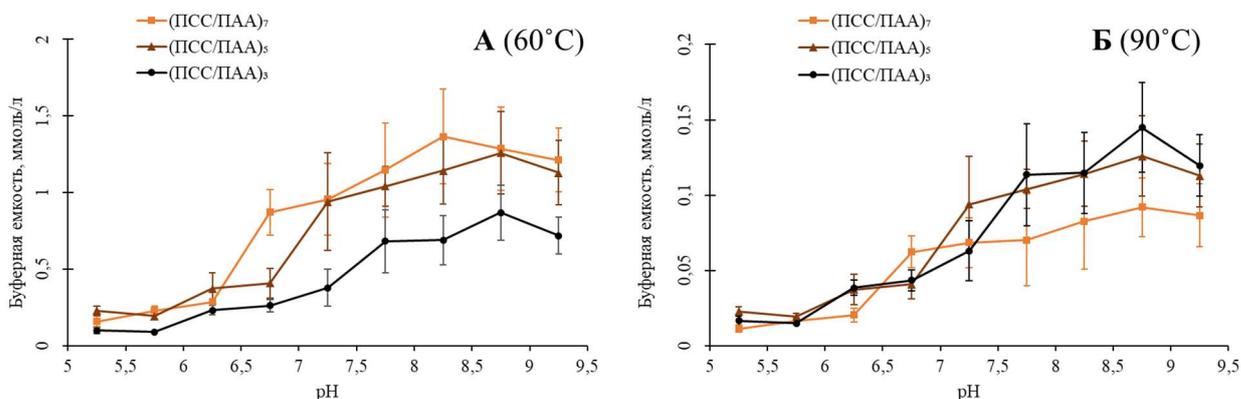


Рисунок 16. Буферная ёмкость $6,6 \times 10^9$ (ПСС/ПАА)₃ (ПСС/ПАА)₅ (ПСС/ПАА)₇ (А).
Буферная ёмкость ПМК, в пересчёте на 1 слой (Б)

Как видно из рисунка 16А, 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, её пересчёт на один слой, представлен на рисунке 16Б. 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.

5.5. 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., 2006b) присутствие специфических ферментов (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 изучается новый подход к декапсулированию в-в.–разрушение ПМК через прорастание инкапсулированных спор бактерии *B.subtilis*, при попадании их в благоприятную среду. Споры бактерий, использованные в работе, имеют эллипсоидальную форму (Garrity et al., 2010) и обладают высокой устойчивостью к длительному химическому, термическому и радиационному воздействию (Riesenman and Nicholson, 2000; Atrih and Foster, 2001). На рисунке 17 представлена микрофотография спор штамма ВКМ В-501Т в оптическом микроскопе.

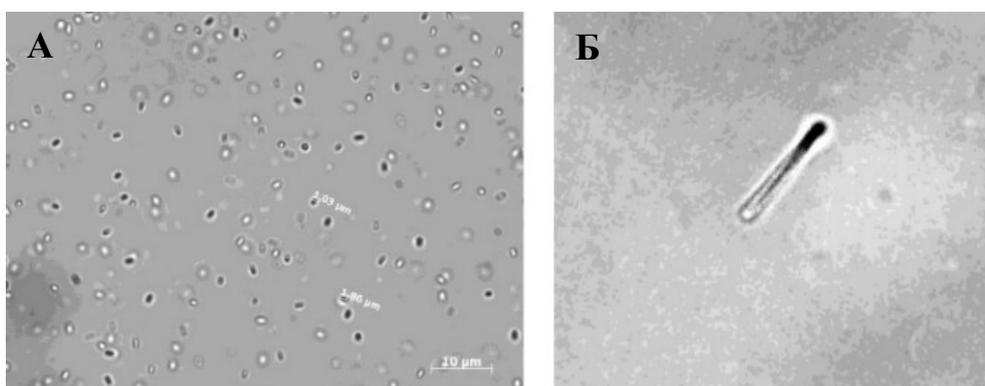


Рисунок 17. Микрофотография спор *B. subtilis* в световом микроскопе (А). Микрофотография прорастания спор *B. subtilis* в световом микроскопе (Б)

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 (Harwood, 1992; Tam et al., 2006).

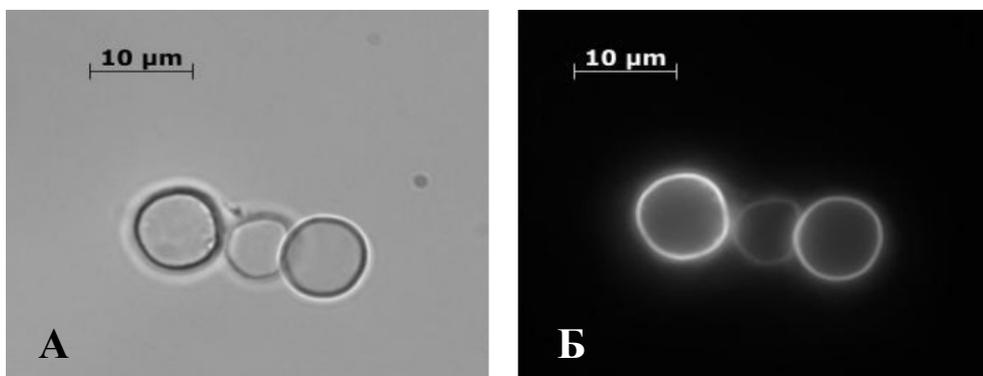


Рисунок 18. Полиэлектролитные микрокапсулы, содержащие споры *B. subtilis*, в питательной среде перед инкубацией. (А) оптическая микроскопия, (Б) флуоресцентная микроскопия

На рисунке 18 приведены микрофотографии ПМК со спорами, полученные перед началом инкубации их в питательной среде, при помощи световой (рис. 18А) и флуоресцентной микроскопии (рис. 18Б). Как видно из рисунка, капсулы представляли собой частицы диаметром 8 ± 1 мкм, правильной круглой формы с чётко выраженной недеформированной оболочкой.

Рост *B.subtilis* происходил в жидкой питательной среде после добавления к ней суспензией микрокапсул со спорами. На рисунке 19 показан процесс бактериального роста с нарушением целостности капсулы, после 4 часов инкубации.

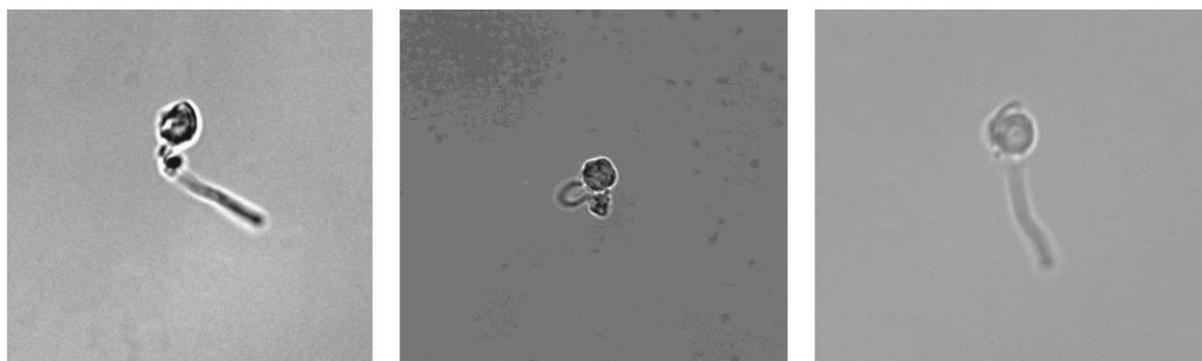


Рисунок 19. Разрушение ПМК за счёт прорастания бактериальных спор

Через 24 часа после попадания ПМК в питательную среду наблюдался бактериальный рост в виде однородного помутнения. Исследование культуральной жидкости с помощью оптической микроскопии показало присутствие клеток (цифра 2 на рисунке 20А) а также деформированные и частично разрушенные ПМК (цифра 1 на рисунке 20А). Было констатировано разрушение 60% микрокапсул, при этом размер разрушенных микрокапсул составляет 5–7 мкм, а размер целых микрокапсул составлял около 2–3 мкм, что позволяет предположить отсутствие в них спор. Параллельно, в качестве контроля, микрокапсулы со спорами инкубировались в стерильной дистиллированной воде, после 24 часов инкубации бактериального роста и деформации ПМК зафиксировано не было.

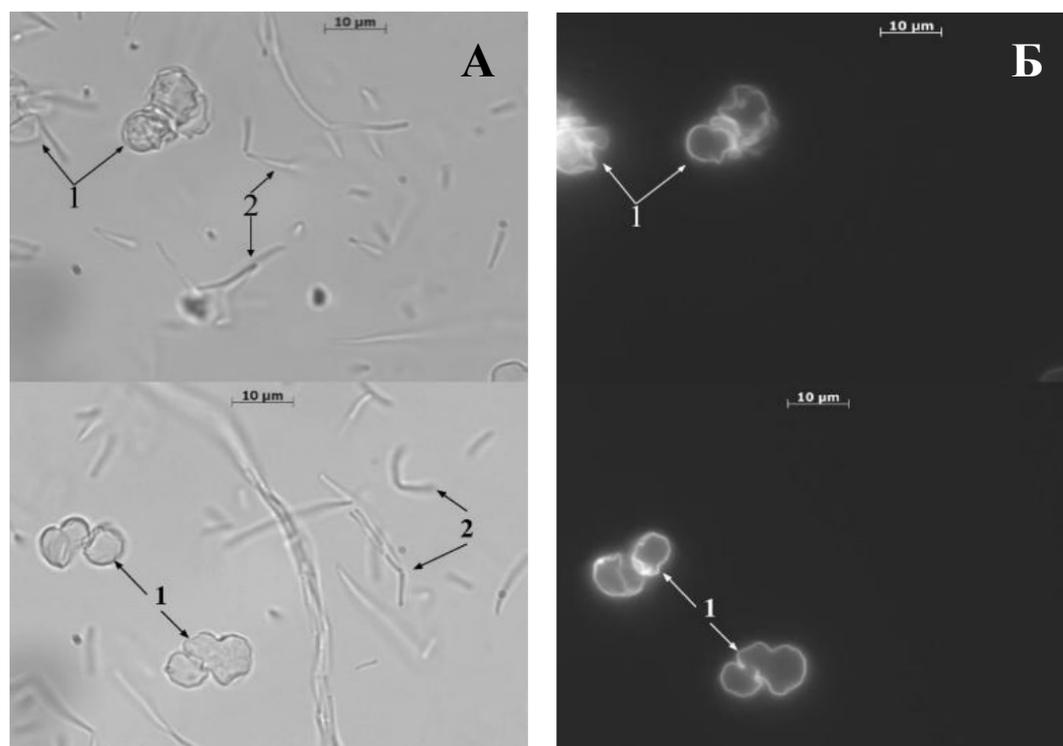


Рисунок 20. Фотографии пробы культуральной жидкости через 24 ч инкубации ПМК в питательной среде. А - световая микроскопия; Б- флуоресцентная микроскопия

Далее был проведён эксперимент по декапсуляции веществ, включённых в капсулу вместе со спорами. Для этого в ПМК было инкапсулировано 2,22 мг ФИТЦ-декстрана. После разрушения ПМК спорами, в растворе было зафиксировано 630 мкг ФИТЦ-декстрана, что составляет 28,4% от инкапсулированной концентрации.

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. На основании вышеизложенного, микрокапсулы содержащие бактериальные споры представляют собой микроконтейнеры, способные к разрушению при попадании в заданные условия среды и высвобождению содержащихся веществ. Технологическая схема получения таких микроконтейнеров представлена на рисунке 21.

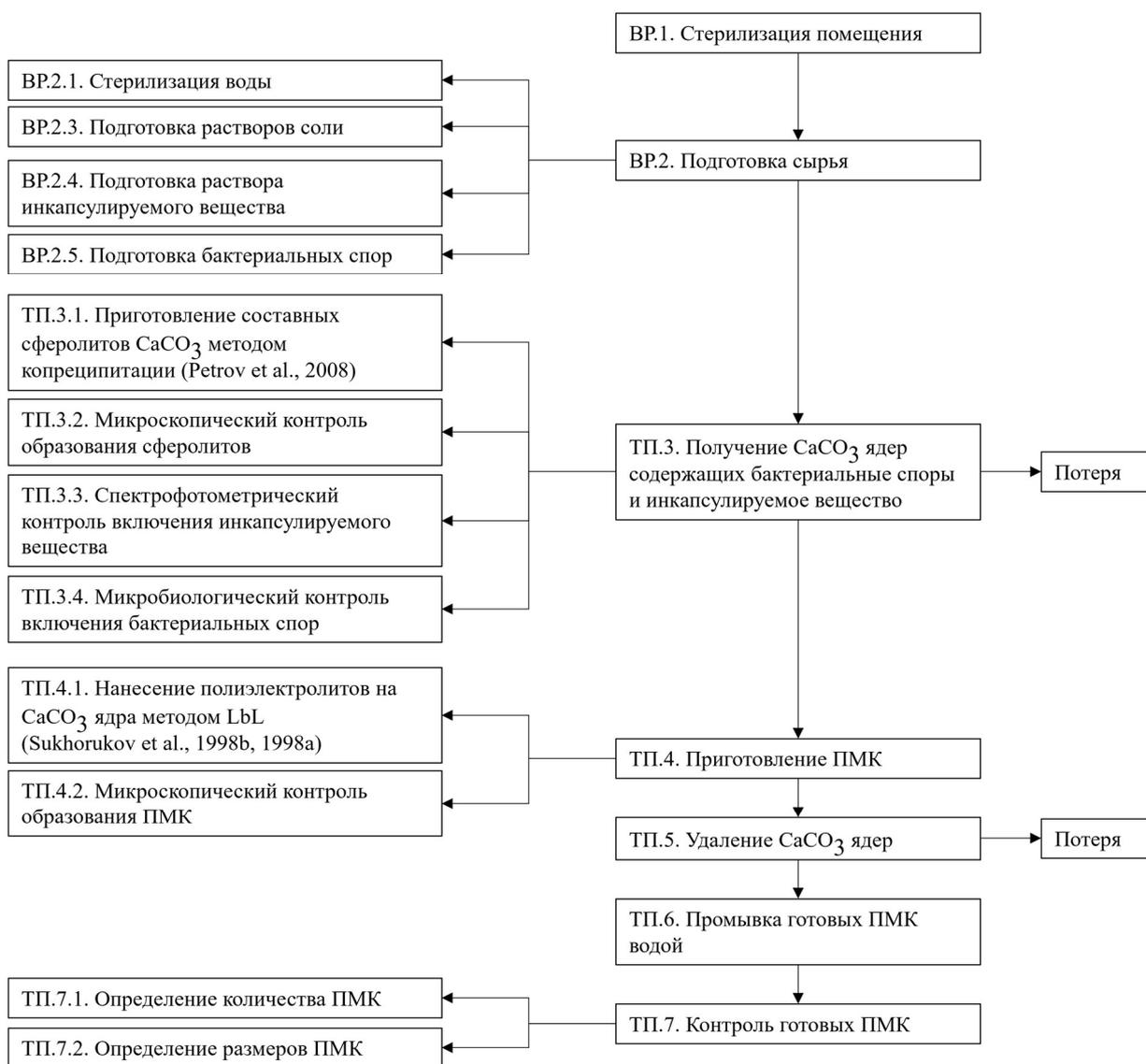


Рисунок 21. Приготовление микроконтейнеров на основе ПМК с бактериальной системой декапсуляции

Изготовление микроконтейнеров, согласно приведённой выше технологической схеме, требует поддержания стерильных условий, в том числе предполагает предварительную стерилизацию воды и растворов солей, требуемых для приготовления CaCO_3 ядра. Изготовление CaCO_3 ядер, содержащих бактериальные споры, происходит методом копреципитации, при одновременном смешивании растворов CaCl_2 , Na_2CO_3 , раствора инкапсулируемого вещества и суспензии бактериальных спор. Количество вещества, вошедшего в CaCO_3 сферолиты, может быть оценено измерением надосадочной жидкости, после осаждения сферолитов. Нанесение полиэлектролитов происходит по методу LbL, описанному выше, в соответствующем разделе главы «материалы и методы». Потери инкапсулированного вещества возможны на стадии разрушения CaCO_3 ядер, при промывке микрокапсул раствором ЭДТА. Оценка размеров и количества полученных микрокапсул происходит после промывки их водой.

Микроконтейнеры с бактериальной системой декапсуляции могут быть применены для доставки веществ в ЖКТ. Основное преимущество технологии декапсуляции веществ, основанной на бактериальных спорах, состоит в том, что она не требует использования дополнительного оборудования, такого как ультразвуковые или лазерные генераторы. 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.

6. 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.

7. 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 слоев нарушается соответствие поверхностного заряда микрокапсул с зарядом их внешнего слоя.
4. Выявлена собственная буферная емкость полиэлектролитных микрокапсул. Увеличение буферной емкости 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*.

8. Список литературы

1. Барсуков Л.И. Липосомы. //Соросовский Образовательный Журнал.— 1998, — Т.10, — С. 2–9.
2. Бегдуллаев А.К., Маншарипова А.Т., Джусипов А.К., Абылайулы Ж.А. Проблема направленного транспорта лекарственных веществ в клинической практике //Терапевтический Вестник.— 2008, — Т.17, — № 1,— С. 32–36.
3. Бородина Т.Н., Румш Л.Д., Кунижев С.М., Сухоруков Г.Б., Ворожцов Г.Н., Фельдман Б.М., Марквичева Е.А. Полиэлектролитные микрокапсулы как системы доставки биологически активных веществ //Биомедицинская химия.— 2007, — Т.53, — № 5, — С. 557–565.
4. Букреева Т.В., Орлова О.А., Сульянов С.Н., Григорьев Ю.В., Дороватовский П.В. Новый способ модификации оболочек полиэлектролитных капсул наночастицами магнетита //Кристаллография.— 2011, — Т.56, — № 5, — С. 940–943.
5. Вальтер Хэслин Х., Патент Ru2126628с1. Способ получения водной суспензии микрокапсул.— 1999.
6. Веевник Д.П. Проблемы и перспективы интраоперационной химиотерапии злокачественных опухолей головного мозга //Весці Нацыянальнай Акадэміі Навук Беларусі.— 2014, — Т.3, — С. 113–123.
7. Демина П.А., Дегтярева Е.В., Кузьмичева Г.М., Букреева Т.В. Полиэлектролитные микрокапсулы, модифицированные наноразмерным диоксидом титана, для адресной доставки лекарственных средств //Вестник МИТХТ им. М.В. Ломоносова.— 2014, — Т.9, — № 4, — С. 73–79.
8. Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Санарова Е.В., Бунятян Н.Д. Наноструктурированные системы доставки противоопухолевых препаратов // Российский биотерапевтический журнал.— 2012, — С.11, — № 4, — С. 21–27.
9. Дубровский А.В., Казакова Л.И., Гужвина Д.В., Шабарчина Л.И., Сухоруков Б.И. Структура и свойства полиэлектролитных нано- и микрокапсул, содержащих транспортные белки крови //Альманах Клинической Медицины.— 2008, — Т.17–2, — С. 325–328.
10. Дубровский А.В., Шабарчина Л.И., Тихоненко С.А. Полиэлектролитный ферментный микродиагностикум с седиментационной системой регистрации для определения мочевины в растворе //Прикладная биохимия и микробиология.— 2017, — № 4, — С. 427–432.

11. Замрий А.В., Викторова Н.В. Умные микроконтейнеры //Национальный отраслевой журнал «Нефтегазовая вертикаль».— 2019, — Т.10, — № 454, — С. 27–31.
12. Каплун А.П., Ле Банг Ш., Краснопольский Ю.М., Швец В.И. Липосомы и другие наночастицы как средство доставки лекарственных веществ. // Вопросы медицинской химии.— 1999, — Т.45, — № 1, — С. 3–12.
13. Комаров М.В. Патент Ru 2 744 839 С1. Микроконтейнеры для защиты микроорганизмов, применяемые в сельском хозяйстве.— 2021.
14. Лен Ж.М., Супрамолекулярная химия. Концепции и перспективы.— 1998. Наука, Новосибирск.
15. Решетилов А.Н., Плеханова Ю.В., Тихоненко С.А., Дубровский А.В. Полиэлектролитные микрокапсулы с уреазой и парамагнитными частицами как основа потенциометрического биосенсора для определения мочевины // Журнал аналитической химии.— 2015, — Т.70, — № 11, — С. 1186–1190.
16. Серегин В.В. Патент Ru 2 581 929 С2. Биологически-активный препарат для защиты растений от вредителей, способ его получения, микроконтейнер для названного препарата, способ его изготовления и способ защиты растений от вредителей.— 2016.
17. Сомов А.Н., Дубровский А.В., Дунайцев И.А., Иванов С.А., Комбарова Т.И., Кочеткова О.Ю., Кравченко Т.Б., Титарева Г.М., Тихоненко С.А., Пинчук А.С., Фирстова В.В., Дентовская С.В. Иммуногенные свойства полиэлектролитных микрокапсул, нагруженных антигенами *Francisella tularensis* или *Yersinia pestis*. //Иммунология.— 2019, — Т.40, — № 5, — С. 52–61.
18. Фомкина М.Г., Ибадуллаева С.Ж. Разработка биодатчика мочевины с применением полимерных технологий для анализов крови и мочи //Научное приборостроение.— 2018, — Т.28, — № 3, — С. 36–43.
19. Цой О.Г., Тайгулов Е.А., Иманбаева Ю.Ш., Бисенова Н.М. Фармакокинетика рифампицина, включенного в аутологичные тени эритроцитов //Клиническая медицина Казахстана.— 2012, — Т.2, — № 25, — С. 81–84
20. Abu-Thabit N.Y. Near-Infrared Ph Sensor Based On A Speek–Polyaniline Polyelectrolyte Complex Membrane// Proceedings. — 2018, — Vol.3, — № 11, — P. 11.
21. Adachi K. Патент Jp 2005120646. Composite Fire-Resistant And Lightweight Building Board.— 2005.
22. Ali S., Bleuel M., Prabhu V.M. Lower Critical Solution Temperature In Polyelectrolyte Complex Coacervates //Acs Macro Letters.— 2019, — Vol.8, — № 3, — P. 289–293.

23. Allen T.M., Cullis P.R. Drug Delivery Systems: Entering The Mainstream // *Science*.— 2004, — Vol.303, — № 5665, — P. 1818–1822.
24. Anandhakumar S., Mahalakshmi V., Raichur A.M. Silver Nanoparticles Modified Nanocapsules For Ultrasonically Activated Drug Delivery // *Materials Science And Engineering: C*.— 2012, — Vol.32, — № 8, — P. 2349–2355.
25. Andersen E.S., Dong M., Nielsen M.M., Jahn K., Subramani R., Mamdouh W., Golas M.M., Sander B., Stark H., Oliveira C.L.P., Pedersen J.S., Birkedal V., Besenbacher F., Gothelf K. V., Kjems J. Self-Assembly Of A Nanoscale DNA Box With A Controllable Lid // *Nature*.— 2009, — Vol.459, — № 7243, — P. 73–76.
26. Andreeva D.V., Kollath A., Brezhneva N., Sviridov D.V., Cafferty B.J., Möhwald H., Skorb E.V. Using A Chitosan Nanolayer As An Efficient Ph Buffer To Protect Ph-Sensitive Supramolecular Assemblies // *Physical Chemistry Chemical Physics*. — 2017, — Vol.19, — № 35, — P. 23843–23848.
27. Andreeva D.V., Skorb E.V., Shchukin D.G. Layer-By-Layer Polyelectrolyte/ Inhibitor Nanostructures For Metal Corrosion Protection // *Acs Applied Materials & Interfaces*.— 2010, — Vol.2, — № 7, — P. 1954–1962.
28. Antipina M.N., Kiryukhin M. V., Chong K., Low H.Y., Sukhorukov G.B. Patterned Microcontainers As Novel Functional Elements For μ tas And Loc // *Lab On A Chip*.— 2009, — Vol.9, — № 10, — P. 1472.
29. Antipov Alexei A., Shchukin D., Fedutik Y., Petrov A.I., Sukhorukov G.B., Möhwald H. Carbonate Microparticles For Hollow Polyelectrolyte Capsules Fabrication // *Colloids And Surfaces A: Physicochemical And Engineering Aspects*. — 2003, — Vol.224, — № 1–3, — P. 175–183.
30. Antipov A.A., Sukhorukov G.B., Donath E., Möhwald H. Sustained Release Properties Of Polyelectrolyte Multilayer Capsules // *The Journal Of Physical Chemistry B*.— 2001, — Vol.105, — № 12, — P. 2281–2284.
31. Antipov A.A., Sukhorukov G.B., Leporatti S., Radtchenko I.L., Donath E., Möhwald H. Polyelectrolyte Multilayer Capsule Permeability Control // *Colloids And Surfaces A: Physicochemical And Engineering Aspects*.— 2002, — Vol.198, — 200, — P. 535–541.
32. Antipov Alexei A., Sukhorukov G.B., Möhwald H. Influence Of The Ionic Strength On The Polyelectrolyte Multilayers' Permeability // *Langmuir*.— 2003, — Vol.19,— № 6, — P. 2444–2448.
33. Ariga K., Lvov Y.M., Kawakami K., Ji Q., Hill J.P. Layer-By-Layer Self-Assembled Shells For Drug Delivery // *Advanced Drug Delivery Reviews*.— 2011, — Vol.63, — № 9, — P. 762–771.
34. Arimoto M., Ichikawa H., Fukumori Y. Microencapsulation Of Water-Soluble Macromolecules With Acrylic Terpolymers By The Wurster Coating Process For Colon-Specific Drug Delivery // *Powder Technology*.— 2004, — Vol.141, — № 3, — P. 177–186.

35. Atrih A., Foster S.J. Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species // *Journal Of Applied Microbiology*.— 2001, — Vol.91, — № 2, — P. 364–372.
36. Bachmann M.F., Jennings G.T. Vaccine Delivery: A Matter Of Size, Geometry, Kinetics And Molecular Patterns // *Nature Reviews Immunology*.— 2010, — Vol.10, — № 11, — P. 787–796.
37. Balabushevitch N.G., Sukhorukov G.B., Moroz N.A., Volodkin D. V., Larionova N.I., Donath E., Mohwald H. Encapsulation Of Proteins By Layer-By-Layer Adsorption Of Polyelectrolytes Onto Protein Aggregates: Factors Regulating The Protein Release // *Biotechnology And Bioengineering*.— 2001, — Vol.76, — № 3, — P. 207–213.
38. Bartkowiak A., Hunkeler D. Alginate–Oligochitosan Microcapsules. Ii. Control Of Mechanical Resistance And Permeability Of The Membrane // *Chemistry Of Materials*.— 2000, — Vol.12, — № 1, — P. 206–212.
39. Bédard M.F., De Geest B.G., Skirtach A.G., Möhwald H., Sukhorukov G.B. Polymeric microcapsules with light responsive properties for encapsulation and release // *Advances In Colloid And Interface Science*.— 2010, — Vol.158, — № 1–2, — P. 2–14.
40. Benjaminsen R. V, Matthebjerg M.A., Henriksen J.R., Moghimi S.M., Andresen T.L. The possible “proton sponge ” effect of polyethylenimine (Pei) does not include change in lysosomal Ph. // *Molecular Therapy*.— 2013, — Vol.21, — № 1, — P. 149–157.
41. Boh Podgornik B., Šumiga B. Microencapsulation technology and its applications in building construction materials // *Rmz - Materials And Geoenvironment*.— 2008, — Vol.55, — P. 329–344.
42. Bordi F., Colby R.H., Cametti C., De Lorenzo L., Gili T. Electrical conductivity of polyelectrolyte solutions in the semidilute and concentrated regime: the role of counterion condensation // *The Journal Of Physical Chemistry B*.— 2002, — Vol.106, — № 27, — P. 6887–6893.
43. Borji H., Ayoub G.M., Bilbeisi R., Nassar N., Malaeb L. How effective are nanomaterials for the removal of heavy metals from water and wastewater? // *Water, Air, & Soil Pollution*.— 2020, — Vol.231, — № 7, — P. 330.
44. Borodina T., Markvicheva E., Kunizhev S., Möhwald H., Sukhorukov G.B., Kreft O. Controlled release of DNA from self-degrading microcapsules // *Macromolecular Rapid Communications*.— 2007, — Vol.28, — № 18–19, — P. 1894–1899.
45. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*.— 1976, — Vol.72, — P. 248–54.

46. Büscher K., Graf K., Ahrens H., Helm C.A. Influence of adsorption conditions on the structure of polyelectrolyte multilayers //Langmuir.— 2002, — Vol.18,— № 9, — P. 3585–3591.
47. Cardoso M.J., Caridade S.G., Costa R.R., Mano J.F. Enzymatic degradation of polysaccharide-based layer-by-layer structures //Biomacromolecules.— 2016,— Vol.17, — № 4, — P. 1347–1357.
48. Carregal-Romero S., Guardia P., Yu X., Hartmann R., Pellegrino T., Parak W.J. Magnetically triggered release of molecular cargo from iron oxide nanoparticle loaded microcapsules //Nanoscale.— 2015, — Vol.7, — № 2, — P. 570–576.
49. Caruso F. Nanoengineering of inorganic and hybrid hollow spheres by colloidal templating //Science.— 1998, — Vol.282, — № 5391, — P. 1111–1114.
50. Caruso F., Susha A.S., Giersig M., Möhwald H. Magnetic core-shell particles: preparation of magnetite multilayers on polymer latex microspheres //Advanced Materials.— 1999, — Vol.11, — № 11, — P. 950–953.
51. Caruso F., Yang W.J., Trau D., Renneberg R. Microencapsulating of uncharged low molecular weight materials by polyelectrolyte multilayer self-assembly // Langmuir.— 2000, — Vol.16, — P. 8932–8936.
52. Chang T.M. Biodegradable semipermeable microcapsules containing enzymes, hormones, vaccines, and other biologicals //Journal Of Bioengineering.— 1976,— Vol.1, — № 1, — P. 25–32.
53. Chavasit V., Kienzle-Sterzer C., Antonio Torres J. Formation and characterization of an insoluble polyelectrolyte complex: chitosan-polyacrylic acid //Polymer Bulletin.— 1988, — Vol.19, — № 3.
54. Chen J.-X., Liang Y., Liu W., Huang J., Chen J.-H. Fabrication of doxorubicin and heparin co-loaded microcapsules for synergistic cancer therapy //International Journal of Biological Macromolecules.— 2014, — Vol.69, — P. 554–560.
55. Cheng Y., Xu Z., Ma M., Xu T. Dendrimers as drug carriers: applications in different routes of drug administration //Journal Of Pharmaceutical Sciences.— 2008, — Vol.97, — № 1, — P. 123–143.
56. Choi Y.C., Cho Y.K., Shin K.-J., Kwon S.-J. Development and application of microcapsule for cement hydration control //Ksce Journal Of Civil Engineering.— 2016, — Vol.20, — № 1, — P. 282–292.
57. Chong J.S., Christiansen E.B., Baer A.D. Rheology of concentrated suspensions // Journal Of Applied Polymer Science.— 1971, — Vol.15, — № 8, — P. 2007–2021.
58. Cui F., Zhang H., Wang D., Tan X., Li X., Li Y., Li J., Li T. Advances in the preparation and application of microencapsulation to protect food functional ingredients //Food & Function.— 2023, — Vol.14, — № 15, — P. 6766–6783.

59. Cundall R.B., Lawton J.B., Murray D., Phillips G.O. Polyelectrolyte complexes, 1. The effect of pH and ionic strength on the stoichiometry of model polycation—polyanion complexes //Die Makromolekulare Chemie.— 1979, — Vol.180, — № 12, — P. 2913–2922.
60. Curtis K.A., Miller D., Millard P., Basu S., Horkay F., Chandran P.L. Unusual salt and pH induced changes in polyethylenimine solutions //Plos One.— 2016, — Vol.11, — № 9, — P. E0158147.
61. Das A., Ray S., Raychaudhuri U., Chakraborty R. Microencapsulation of probiotic bacteria and its potential application in food technology //International Journal Of Agriculture, Environment And Biotechnology.— 2014, — Vol.7, — № 1, — P. 47.
62. Davidson R.N., Martino L. Di, Gradoni L., Giacchino R., Russo R., Gaeta G.B., Pempinello R., Scott S., Raimondi F., Cascio A., Prestileo T., Caldeira L., Wilkinson R.J., Bryceson A.D.M. Liposomal amphotericin B (ambisome) in mediterranean visceral leishmaniasis: a multi-centre trial //Qjm: An International Journal of Medicine.— 1994, — Vol.87, — № 2, — P. 75–81.
63. De Geest B.G., Déjugnat C., Sukhorukov G.B., Braeckmans K., De Smedt S.C., Demeester J. Self-rupturing microcapsules //Advanced Materials.— 2005, — Vol.17, — № 19, — P. 2357–2361.
64. De Cock L.J., De Koker S., De Geest B.G., Grooten J., Vervaet C., Remon J.P., Sukhorukov G.B., Antipina M.N. Polymeric multilayer capsules in drug delivery //Angewandte Chemie International Edition.— 2010, — Vol.49, — № 39, — P. 6954–6973.
65. De Geest B.G., Déjugnat C., Verhoeven E., Sukhorukov G.B., Jonas A.M., Plain J., Demeester J., De Smedt S.C. Layer-by-layer coating of degradable microgels for pulsed drug delivery //Journal Of Controlled Release.— 2006, — Vol.116, — № 2, — P. 159–169.
66. De Geest Bruno G., Jonas A.M., Demeester J., De Smedt S.C. Glucose-responsive polyelectrolyte capsules //Langmuir.— 2006, — Vol.22, — № 11, — P. 5070–5074.
67. De Geest B.G., Skirtach A.G., Mamedov A.A., Antipov A.A., Kotov N.A., De Smedt S.C., Sukhorukov G.B. Ultrasound-triggered release from multilayered capsules //Small.— 2007, — Vol.3, — № 5, — P. 804–808.
68. De Geest B.G., Vandenbroucke R.E., Guenther A.M., Sukhorukov G.B., Hennink W.E., Sanders N.N., Demeester J., De Smedt S.C. Intracellularly degradable polyelectrolyte microcapsules //Advanced Materials.— 2006, — Vol.18, — № 8, — P. 1005–1009.
69. De Koker S., De Geest B.G., Cuvelier C., Ferdinande L., Deckers W., Hennink W.E., De Smedt S.C., Mertens N. In vivo cellular uptake, degradation, and

- biocompatibility of polyelectrolyte microcapsules //Advanced functional materials.— 2007, — Vol.17, — № 18, — P. 3754–3763.
70. De Koker S., De Geest B.G., Singh S.K., De Rycke R., Naessens T., Van Kooyk Y., Demeester J., De Smedt S.C., Grooten J. Polyelectrolyte microcapsules as antigen delivery vehicles to dendritic cells: uptake, processing, and cross-presentation of encapsulated antigens //Angewandte Chemie International Edition.— 2009, —Vol.48, — № 45, — P. 8485–8489.
 71. De Rose R., Zelikin A.N., Johnston A.P.R., Sexton A., Chong S., Cortez C., Mulholland W., Caruso F., Kent S.J. Binding, internalization, and antigen presentation of vaccine-loaded nanoengineered capsules in blood //Advanced Materials.— 2008, — Vol.20, — № 24, — P. 4698–4703.
 72. De Temmerman M.-L., Demeester J., De Vos F., De Smedt S.C. Encapsulation performance of layer-by-layer microcapsules for proteins //Biomacromolecules.— 2011, — Vol.12, — № 4, — P. 1283–1289.
 73. Decher G., Hong J.-D. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process, 1 consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles on charged surfaces //Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia.—1991a, — Vol.46, — № 1, — P. 321–327.
 74. Decher G., Hong J.-D. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process, 1 consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles on charged surfaces //Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia.—1991b, — Vol.46, — № 1, — P. 321–327.
 75. Decher G., Hong J.D., Schmitt J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces //Thin Solid Films.— 1992, —Vol.210–211, — P. 831–835.
 76. Decher G., Lvov Y., Schmitt J. Proof of multilayer structural organization in self-assembled polycation-polyanion molecular films //Thin solid films.— 1994, — Vol.244, — № 1–2, — P. 772–777.
 77. Degen P., Peschel S., Rehage H. Stimulated aggregation, rotation, and deformation of magnetite-filled microcapsules in external magnetic fields //Colloid and polymer science.— 2008, — Vol.286, — № 8–9.
 78. Déjugnat C., Haložan D., Sukhorukov G.B. Defined picogram dose inclusion and release of macromolecules using polyelectrolyte microcapsules //Macromolecular rapid communications.— 2005, — Vol.26, — № 12, — P. 961–967.
 79. Déjugnat C., Sukhorukov G.B. pH-Responsive properties of hollow polyelectrolyte microcapsules templated on various cores //Langmuir.— 2004,— Vol.20, — № 17, — P. 7265–7269.

80. Del Mercato L.L., Rivera-Gil P., Abbasi A.Z., Ochs M., Ganas C., Zins I., Sönnichsen C., Parak W.J. LbL multilayer capsules: recent progress and future outlook for their use in life sciences //Nanoscale.— 2010, — Vol.2, — № 4, —P. 458.
81. Desai K.G.H., Jin Park H. Recent developments in microencapsulation of food ingredients //Drying Technology.— 2005, — Vol.23, — № 7, — P. 1361–1394.
82. Donath E., Sukhorukov G.B., Caruso F., Davis S.A., Möhwald H. Novel hollow polymer shells by colloid-templated assembly of polyelectrolytes //Angewandte Chemie International Edition.— 1998, — Vol.37, — № 16, — P. 2201–2205.
83. Dubrovskii A. V., Kim A.L., Tikhonenko S.A. Method of determining the localization of charges on the surface //Journal Of Electrostatics.— 2019, — Vol.102, — P. 103376.
84. Dubrovskii A. V., Shabarchina L.I., Kim Y.A., Sukhorukov B.I. Influence of the temperature on polyelectrolyte microcapsules: light scattering and confocal microscopy data //Russian Journal of Physical Chemistry.— 2006, — Vol.80, —№ 10, — P. 1703–1707.
85. Eneh C.I., Kastinen T., Oka S., Batys P., Sammalkorpi M., Lutkenhaus J.L. Quantification of water–ion pair interactions in polyelectrolyte multilayers using a quartz crystal microbalance method //Acs Polymers Au.— 2022, — Vol.2, —№ 4, — P. 287–298.
86. Estrela-Lopis I., Leporatti S., Clemens D., Donath E. Polyelectrolyte multilayer hollow capsules studied by small-angle neutron scattering (SANS) //Soft Matter.— 2009, — Vol.5, — № 1, — P. 214–219.
87. Ethica S.N. Current application of microencapsulation technology in bioremediation of polluted groundwater //World Journal of Agriculture and Soil Science.— 2020, — Vol.4, — № 4.
88. Fanger G.O. Microencapsulation: a brief history and introduction/ In: Microencapsulation— 1974. Springer US, Boston, Ma, P. 1–20.
89. Faroughi S.A., Huber C. Crowding-based rheological model for suspensions of rigid bimodal-sized particles with interfering size ratios //Physical Review E.— 2014, — Vol.90, — № 5, — P. 052303.
90. Feng Z., Gao C., Shen J. Spontaneous deposition of FITS-labeled dextran into covalently assembled (PGMA/PAH) 4 Microcapsules //Macromolecular Chemistry And Physics.— 2009, — Vol.210, — № 17, — P. 1387–1393.
91. Gallops C.E., Yu C., Ziebarth J.D., Wang Y. Effect of the protonation level and ionic strength on the structure of linear polyethyleneimine //Acs Omega.—2019, — Vol.4, — № 4, — P. 7255–7264.
92. Garrity G., De Vos P., Jones D., Kreig N., Ludwig W., Rainey F., Schleifer K., B. Whitman W. Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 3. The Firmicutes.— 2010.

93. Gåserød O. Microcapsules of alginate–chitosan. II. A study of capsule stability and permeability //Biomaterials.— 1999, — Vol.20, — № 8, — P. 773–783.
94. Ge X., Wei M., He S., Yuan W.-E. Advances of non-ionic surfactant vesicles (niosomes) and their application in drug delivery //Pharmaceutics.— 2019, — Vol.11, — № 2, — P. 55.
95. Ghosh S.K. Functional coatings and microencapsulation: a general perspective/ In: Functional Coatings— 2006,. Wiley, Pp. 1–28.
96. Gibney K.A., Sovadinova I., Lopez A.I., Urban M., Ridgway Z., Caputo G.A., Kuroda K. Poly(ethylene imine)S as antimicrobial agents with selective activity // Macromolecular Bioscience.— 2012, — Vol.12, — № 9, — P. 1279–1289.
97. Gregoriadis G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems // Trends In Biotechnology.— 1995, — Vol.13, — № 12, — P. 527–537.
98. Gregoriadis G., Allison A.C., Poste G. (Eds.) Immunological adjuvants and vaccines— 1989. Springer US, Boston, MA.
99. Gunawan S.T., Liang K., Such G.K., Johnston A.P.R., Leung M.K.M., Cui J., Caruso F. Engineering enzyme-cleavable hybrid click capsules with a pH-sheddable coating for intracellular degradation //Small.— 2014, — P. 4080-4086.
100. Harwood C.R. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. //Trends In Biotechnology.— 1992, — Vol.10, — P. 247–256.
101. Haynie D.T., Palath N., Liu Y., Li B., Pargaonkar N. Biomimetic nanostructured materials: inherent reversible stabilization of polypeptide microcapsules // Langmuir.— 2005, — Vol.21, — № 3, — P. 1136–1138.
102. Heidebach T., Först P., Kulozik U. Microencapsulation of probiotic cells for food applications //Critical Reviews In Food Science And Nutrition.— 2012, — Vol.52, — № 4, — P. 291–311.
103. Higashizaka E. Патент JP 2004076402. Formation of leveling concrete or base concrete using Hinoki oil in building construction for insect repelling, corrosion prevention, antibacterial action and deodorization.— 2004.
104. Higashizaka E. Патент JP 2002146933. Foaming building material having microcapsules containing hinokithiols for antibacterial effect for applying to walls, floors and ceilings.— 2002a,. Jp 2002146933.
105. Higashizaka E. Патент JP 2002309688. Wall panels from plaster and microcapsules containing hinokithiol for insect killing effect and antibacterial effect.— 2002b.
106. Hu S.-H., Tsai C.-H., Liao C.-F., Liu D.-M., Chen S.-Y. Controlled rupture of magnetic polyelectrolyte microcapsules for drug delivery //Langmuir.— 2008, — Vol.24, — № 20.

107. Hu Y., Liu C., Li D., Long Y., Song K., Tung C.-H. Magnetic compression of polyelectrolyte microcapsules for controlled release //Langmuir.— 2015, — Vol.31, — № 41, — P. 11195–11199.
108. Humblet-Hua N.-P.K., Van Der Linden E., Sagis L.M.C. Microcapsules with protein fibril reinforced shells: effect of fibril properties on mechanical strength of the shell //Journal of agricultural and food chemistry.— 2012, — Vol.60, — № 37, — P. 9502–9511.
109. Immordino M.L., Dosio F., Cattell L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential //Int J Nanomedicine.— 2006, — Vol.1, — № 3, — P. 297–315.
110. Itoh Y., Matsusaki M., Kida T., Akashi M. Enzyme-responsive release of encapsulated proteins from biodegradable hollow capsules //Biomacromolecules.— 2006, — Vol.7, — № 10, — P. 2715–2718.
111. Jain K.K. An overview of drug delivery systems. 2020. P. 1–54.
112. Jańczyk M., Kutyla A., Sollohub K., Wosicka H., Cal K., Ciosek P. Electronic tongue for the detection of taste-masking microencapsulation of active pharmaceutical substances //Bioelectrochemistry.— 2010, — Vol.80, — № 1, — P. 94–98.
113. Jia Y., Fei J., Cui Y., Yang Y., Gao L., Li J. pH-Responsive polysaccharide microcapsules through covalent bonding assembly //Chem. Commun.— 2011, — Vol.47, — № 4, — P. 1175–1177.
114. Kanellopoulos A., Giannaros P., Al-Tabbaa A., The Effect Of Varying Volume Fraction Of Microcapsules On Fresh, Mechanical And Self-Healing Properties Of Mortars. //Construction And Building Materials.— 2016, — Vol.122, — P. 577–593.
115. Katagiri K., Imai Y., Koumoto K., Variable On-Demand Release Function Of Magneto-responsive Hybrid Capsules //Journal Of Colloid And Interface Science.— 2011, — Vol.361, — № 1, — P. 109–114.
116. Katagiri K., Koumoto K., Iseya S., Sakai M., Matsuda A., Caruso F. Tunable UV-responsive organic–inorganic hybrid capsules //Chemistry of Materials.— 2009, — Vol.21, — № 2, — P. 195–197.
117. Katagiri K., Nakamura M., Koumoto K. Magneto-responsive smart capsules formed with polyelectrolytes, lipid bilayers and magnetic nanoparticles //Acs Applied Materials & Interfaces.— 2010, — Vol.2, — № 3, — P. 768–773.
118. Kazakova L.I., Dubrovskii A. V, Moshkov D.A., Shabarchina L.I., Sukhorukov B.I. An electron microscopy study of the structure of polyelectrolyte microcapsules containing protein and containing no protein //Biofizika.— 2007a, — Vol.52, — № 5, — P. 850–4.
119. Kazakova L.I., Dubrovskii A. V, Moshkov D.A., Shabarchina L.I., Sukhorukov B.I., [An Electron Microscopy Study Of The Structure Of Polyelectrolyte

- Microcapsules Containing Protein And Containing No Protein]. //Biofizika.— 2007b, — Vol.52, — № 5, — P. 850–4.
120. Kazakova L.I., Dubrovskii A. V, Moshkov D.A., Shabarchina L.I., Sukhorukov B.I. An electron microscopy study of the structure of polyelectrolyte microcapsules containing protein and containing no protein //Biofizika.— N.D. — Vol.52, — № 5, — P. 850–4.
 121. Kazakova L.I., Shabarchina L.I., Anastasova S., Pavlov A.M., Vadgama P., Skirtach A.G., Sukhorukov G.B. Chemosensors and biosensors based on polyelectrolyte microcapsules containing fluorescent dyes and enzymes //Analytical And Bioanalytical Chemistry.— 2013, — Vol.405, — № 5, — P. 1559–1568.
 122. Kazakova L.I., Shabarchina L.I., Sukhorukov G.B. Co-encapsulation of enzyme and sensitive dye as a tool for fabrication of microcapsule based sensor for urea measuring //Physical Chemistry Chemical Physics.— 2011, — Vol.13, — № 23, — P. 11110.
 123. Kida T., Mouri M., Akashi M. Fabrication of hollow capsules composed of Poly(Methyl Methacrylate) stereocomplex films //Angewandte Chemie International Edition.— 2006, — Vol.45, — № 45, — P. 7534–7536.
 124. Kim A.L., Dubrovskii A. V., Musin E. V., Tikhonenko S.A. Sorption of salts of various metals by polyelectrolyte microcapsules //International Journal Of Molecular Sciences.— 2023, — Vol.24, — № 3, — P. 2834.
 125. Kim A.L., Musin E. V., Dubrovskii A. V., Tikhonenko S.A. Qualitative and quantitative methods detection of SDS based on polyelectrolyte microcapsules // Scientific Reports.— 2022, — Vol.12, — № 1, — P. 232.
 126. Klitzing R., Möhwald H. A realistic diffusion model for ultrathin polyelectrolyte films //Macromolecules.— 1996, — Vol.29, — № 21, — P. 6901–6906.
 127. Kochetkova O.Y., Kazakova L.I., Moshkov D.A., Vinokurov M.G., Shabarchina L.I. Incorporation of proteins into polyelectrolyte microcapsules by coprecipitation and adsorption //Russian Journal Of Bioorganic Chemistry.— 2013, — Vol.39, — № 5, — P. 504–509.
 128. Köhler K., Möhwald H., Sukhorukov G.B. Thermal behavior of polyelectrolyte multilayer microcapsules: 2. Insight into molecular mechanisms for the PDADMAC/PSS system //The Journal of Physical Chemistry B.— 2006, — Vol.110, — № 47, — P. 24002–24010.
 129. Köhler K., Shchukin D.G., Möhwald H., Sukhorukov G.B. Thermal behavior of polyelectrolyte multilayer microcapsules. 1. The effect of odd and even layer number //The Journal of Physical Chemistry B.— 2005, — Vol.109, — № 39, — P. 18250–18259.
 130. Köhler K., Sukhorukov G.B. Heat treatment of polyelectrolyte multilayer capsules: A versatile method for encapsulation //Advanced functional materials.— 2007, — Vol.17, — № 13, — P. 2053–2061.

131. 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, — № 7, — P. 1189–1195.
132. Koo H.Y., Lee H.-J., Kim J.K., Choi W.S. UV-Triggered encapsulation and release from polyelectrolyte microcapsules decorated with photoacid generators // Journal of Materials Chemistry.— 2010, — Vol.20, — № 19, — P. 3932.
133. Krasemann L. Self-assembled polyelectrolyte multilayer membranes with highly improved pervaporation separation of ethanol/water mixtures //Journal of Membrane Science.— 2001, — Vol.181, — № 2, — P. 221–228.
134. Krasemann L., Tieke B. Selective ion transport across self-assembled alternating multilayers of cationic and anionic polyelectrolytes //Langmuir.— 2000, — Vol.16, — № 2, — P. 287–290.
135. Krasemann L., Tieke B. Ultrathin self-assembled polyelectrolyte membranes for pervaporation //Journal Of Membrane Science.— 1998, — Vol.150, — № 1, — P. 23–30.
136. Kreft O., Javier A.M., Sukhorukov G.B., Parak W.J. Polymer microcapsules as mobile local pH-sensors //Journal Of Materials Chemistry.— 2007, — Vol.17, — № 42, — P. 4471.
137. Kumari P. Microencapsulation in textiles /In: Innovative Nanocomposites For The Remediation And Decontamination Of Wastewater— 2022. IGI Global, Pp. 185–193.
138. Lammers T., Hennink W.E., Storm G. Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice //British Journal of Cancer.— 2008, — Vol.99, — № 3, — P. 392–397.
139. Lee H., Jeong Y., Park T.G. Shell cross-linked hyaluronic acid/polylysine layer-by-layer polyelectrolyte microcapsules prepared by removal of reducible hyaluronic acid microgel cores //Biomacromolecules.— 2007, — Vol.8, — № 12, — P. 3705–3711.
140. Levy T., Déjugnat C., Sukhorukov G.B. Polymer microcapsules with carbohydrate-sensitive properties //Advanced Functional Materials.— 2008, — Vol.18, — № 10, — P. 1586–1594.
141. Lomas H., Johnston A.P.R., Such G.K., Zhu Z., Liang K., Van Koeverden M.P., Alongkornchotikul S., Caruso F. Polymersome-loaded capsules for controlled release of DNA //Small.— 2011, — Vol.7, — № 14, — P. 2109–2119.
142. Long Y., Liu C., Zhao B., Song K., Yang G., Tung C.-H. Bio-Inspired controlled release through compression–relaxation cycles of microcapsules//NPG Asia Materials.— 2015, — Vol.7, — № 1.
143. Longo W.E., Goldberg E.P. Hydrophilic albumin microspheres. 1985. P. 18–26.

144. Lu Z., Prouty M.D., Guo Z., Golub V.O., Kumar C.S.S.R., Lvov Y.M. Magnetic switch of permeability for polyelectrolyte microcapsules embedded with Co@Au nanoparticles //Langmuir.— 2005, — Vol.21, — № 5, — P. 2042–2050.
145. Lvov Y., Antipov A.A., Mamedov A., Möhwald H., Sukhorukov G.B. Urease encapsulation in nanoorganized Microshells. //Nano Letters.— 2001, — Vol.1, — № 3, — P. 125–128.
146. Mak W.C., Cheung K.Y., Trau D. Influence of different polyelectrolytes on layer-by-layer microcapsule properties: encapsulation efficiency and colloidal and temperature stability //Chemistry of Materials.— 2008, — Vol.20, — № 17, — P. 5475–5484.
147. Mann H.B., Whitney D.R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other //The Annals of Mathematical Statistics.— 1947, — Vol.18, — № 1, — P. 50–60.
148. Marciel A.B., Srivastava S., Tirrell M. V. Structure and rheology of polyelectrolyte complex coacervates //Soft Matter.— 2018, — Vol.14, — № 13, — P. 2454–2464.
149. Matsumura T., Takaoka T., Katsuta H. A Polyelectrolyte buffer system for bacterial and mammalian cell culture //Experimental Cell Research.— 1968, — Vol.53, — № 2–3, — P. 337–347.
150. Mayya K.S., Schoeler B., Caruso F. Preparation and organization of nanoscale polyelectrolyte-coated gold nanoparticles //Advanced functional materials.— 2003, — Vol.13, — № 3, — P. 183–188.
151. Mendanha D. V., Molina Ortiz S.E., Favaro-Trindade C.S., Mauri A., Monterrey-Quintero E.S., Thomazini M. Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/Pectin //Food Research International.— 2009, — Vol.42, — № 8, — P. 1099–1104.
152. Moghimi S.M., Hunter A.C., Clifford M. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice //Pharmacological Reviews.— 2001, — Vol.53, — № 2, — P. 283–318.
153. Mooney M. The viscosity of a concentrated suspension of spherical particles //Journal Of Colloid Science.— 1951, — Vol.6, — № 2, — P. 162–170.
154. Moore N.M., Sheppard C.L., Barbour T.R., Sakiyama-Elbert S.E. The effect of endosomal escape peptides on in vitro gene delivery of polyethylene glycol-based vehicles //The Journal of Gene Medicine.— 2008, — Vol.10, — № 10, — P. 1134–1149.
155. Muñoz Javier A., Del Pino P., Bedard M.F., Ho D., Skirtach A.G., Sukhorukov G.B., Plank C., Parak W.J. Photoactivated release of cargo from the cavity of polyelectrolyte capsules to the cytosol of cells //Langmuir.— 2008, — Vol.24, — № 21, — P. 12517–12520.

156. Muñoz Javier A., Kreft O., Semmling M., Kempter S., Skirtach A.G., Bruns O.T., Del Pino P., Bedard M.F., Rädler J., Käs J., Plank C., Sukhorukov G.B., Parak W.J. Uptake of colloidal polyelectrolyte-coated particles and polyelectrolyte multilayer capsules by living cells // *Advanced Materials*.— 2008, — Vol.20, — № 22, — P. 4281–4287.
157. Namdee K., Thompson A.J., Golinski A., Mocherla S., Bouis D., Eniola-Adefeso O. In vivo evaluation of vascular-targeted spheroidal microparticles for imaging and drug delivery application in atherosclerosis // *Atherosclerosis*.— 2014, — Vol.237, — № 1, — P. 279–286.
158. Neitzel A.E., De Hoe G.X., Tirrell M. V. Expanding the structural diversity of polyelectrolyte complexes and polyzwitterions // *Current Opinion in Solid State and Materials Science*.— 2021, — Vol.25, — № 2, — P. 100897.
159. Nelson G. Microencapsulation in textile finishing // *Review of progress in coloration and related topics*.— 2001, — Vol.31, — № 1, — P. 57–64.
160. Nevozhay D., Kańska U., Budzyńska R., Boratyński J. Current status of research on conjugates and related drug delivery systems in the treatment of cancer and other diseases // *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej (Online)*.— 2007, — Vol.61, — P. 350–60.
161. Nichols J.W., Bae Y.H. EPR: Evidence and Fallacy // *Journal of Controlled Release*.— 2014, — Vol.190, — P. 451–464.
162. Nifontova G., Zvaigzne M., Baryshnikova M., Korostylev E., Ramos-Gomes F., Alves F., Nabiev I., Sukhanova A. Next-generation theranostic agents based on polyelectrolyte microcapsules encoded with semiconductor nanocrystals: development and functional characterization // *Nanoscale Research Letters*.— 2018, — Vol.13, — № 1, — P. 30.
163. Noshad M., Mohebbi M., Shahidi F., Koocheki A. Effect of layer-by-layer polyelectrolyte method on encapsulation of vanillin // *International Journal of Biological Macromolecules*.— 2015, — Vol.81, — P. 803–808.
164. Oerlemans C., Bult W., Bos M., Storm G., Nijssen J.F.W., Hennink W.E. Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release // *Pharmaceutical Research*.— 2010, — Vol.27, — № 12, — P. 2569–2589.
165. Ogawa S., Decker E.A., McClements D.J. Production and characterization of O/W emulsions containing cationic droplets stabilized by lecithin–chitosan membranes // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.— 2003, — Vol.51, — № 9, — P. 2806–2812.
166. Palamà I.E., Coluccia A.M.L., Torre A. Della, Vergaro V., Perrone E., Cingolani R., Rinaldi R., Leporatti S. Multilayered polyelectrolyte capsules and coated Colloids: cytotoxicity and uptake by cancer cells // *Science of Advanced Materials*.— 2010, — Vol.2, — № 2, — P. 138–150.

167. Park M.-K., Deng S., Advincula R.C. Sustained release control via photo-cross-linking of polyelectrolyte layer-by-layer hollow capsules //Langmuir.— 2005, — Vol.21, — № 12, — P. 5272–5277.
168. Parthy K. Патент DE Patent 10221939. Use of microencapsulated water for increasing fire resistance of construction materials.— 2003. 10221939.
169. Patel R., Upadhyay R.V., Mehta R.V. Microscopic observation of magnetodeformational effects in magnetic nanocomposite micelles //Journal of Physics: Condensed Matter.— 2008, — Vol.20, — № 20.
170. Pavlov A.M., Saez V., Cobley A., Graves J., Sukhorukov G.B., Mason T.J. Controlled protein release from microcapsules with composite shells using high frequency ultrasound—potential for in vivo medical use //Soft Matter.— 2011, — Vol.7, — № 9, — P. 4341.
171. Peng X., Umer M., Pervez M.N., Hasan K.M.F., Habib M.A., Islam M.S., Lin L., Xiong X., Naddeo V., Cai Y. Biopolymers-based microencapsulation technology for sustainable textiles development: a short review //Case Studies in Chemical and Environmental Engineering.— 2023, — Vol.7, — P. 100349.
172. Petrov A.I., Gavryushkin A. V., Sukhorukov G.B. Effect of temperature, pH and shell thickness on the rate of Mg^{2+} and Ox^{2-} release from multilayered polyelectrolyte shells deposited onto microcrystals of magnesium oxalate //The Journal of Physical Chemistry B.— 2003, — Vol.107, — № 3, — P. 868–875.
173. Petrov A.I., Volodkin D.V., Sukhorukov G.B. Protein-calcium carbonate coprecipitation: a tool for protein encapsulation //Biotechnology Progress.— 2008, — Vol.21, — № 3, — P. 918–925.
174. Plekhanova Y. V., Tikhonenko S.A., Dubrovsky A. V., Kim A.L., Musin E. V., Wang G.-J., Kuznetsova I.E., Kolesov V. V., Reshetilov A.N. Comparative study of electrochemical sensors based on enzyme immobilized into polyelectrolyte microcapsules and into chitosan gel //Analytical Sciences.— 2019, — Vol.35, — № 9, — P. 1037–1043.
175. Pommersheim R., Schrezenmeir J., Vogt W. Immobilization of enzymes by multilayer microcapsules //Macromolecular Chemistry and Physics.— 1994, — Vol.195, — № 5, — P. 1557–1567.
176. Postma A., Yan Y., Wang Y., Zelikin A.N., Tjijto E., Caruso F. Self-polymerization of dopamine as a versatile and robust technique to prepare polymer capsules //Chemistry of Materials.— 2009, — Vol.21, — № 14, — P. 3042–3044.
177. Qiu X., Donath E., Möhwald H. Permeability of ibuprofen in various polyelectrolyte multilayers //Macromolecular Materials and Engineering.— 2001, — Vol.286, — № 10, — P. 591.
178. Radhakrishnan K., Tripathy J., Raichur A.M.,. Dual Enzyme Responsive Microcapsules Simulating An “Or” Logic Gate For Biologically Triggered Drug

- Delivery Applications //Chemical Communications.— 2013, — Vol.49, — № 47, — P. 5390.
179. Rae J., Ashokkumar M., Eulaerts O., Von Sonntag C., Reisse J., Grieser F., Estimation Of Ultrasound Induced Cavitation Bubble Temperatures In Aqueous Solutions. //Ultrasonics Sonochemistry.— 2005, — Vol.12, — № 5, — P. 325–329.
 180. Rathore S., Desai P.M., Liew C.V., Chan L.W., Heng P.W.S. Microencapsulation of microbial cells //Journal of food engineering.— 2013, — Vol.116, — № 2, — P. 369–381.
 181. Reibetanz U., Claus C., Typlt E., Hofmann J., Donath E. Defoliation and plasmid delivery with layer-by-layer coated colloids //Macromolecular Bioscience.— 2006, — Vol.6, — № 2, — P. 153–160.
 182. Reis E.A., Bispo E.P., Leão M.H.M.R., Leite S.G.F. Comparison of different slow-release nutrient composites produced to stimulate microorganisms // Ambiente E Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science.— 2018, — Vol.13, — № 6, — P. 1.
 183. Reis E.A., Rocha-Leão M.H.M., Leite S.G.F. Slow-release nutrient capsules for microorganism stimulation in oil remediation //Applied Biochemistry and Biotechnology.— 2013, — Vol.169, — № 4, — P. 1241–1249.
 184. Richard I., Thibault M., De Crescenzo G., Buschmann M.D., Lavertu M. Ionization behavior of chitosan and chitosan–DNA polyplexes indicate that chitosan has a similar capability to induce a proton-sponge effect as PEI //Biomacromolecules.— 2013, — Vol.14, — № 6, — P. 1732–1740.
 185. Riesenman P.J., Nicholson W.L. Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation //Applied and Environmental Microbiology.— 2000, — Vol.66, — № 2, — P. 620–626.
 186. Ropert C. Liposomes as a gene delivery system //Brazilian Journal of Medical and Biological Research.— 1999, — Vol.32, — № 2, — P. 163–169.
 187. Sadovoy A.V., Kiryukhin M.V., Sukhorukov G.B., Antipina M.N. Kinetic stability of water-dispersed oil droplets encapsulated in a polyelectrolyte multilayer shell //Physical Chemistry Chemical Physics.— 2011, — Vol.13, — № 9, — P. 4005.
 188. Saikaew R., Meesorn W., Zoppe J.O., Weder C., Dubas S.T., Influence Of The Salt Concentration On The Properties Of Salt-Free Polyelectrolyte Complex Membranes. //Macromolecular Materials And Engineering.— 2019, — Vol.304, — № 9, — P. 1900245.
 189. Santos J.L., Nouri A., Fernandes T., Rodrigues J., Tomás H. Gene delivery using biodegradable polyelectrolyte microcapsules prepared through the layer-by-layer technique //Biotechnology Progress.— 2012, — Vol.28, — № 4, — P. 1088–1094.

190. Sarier N., Onder E. The manufacture of microencapsulated phase change materials suitable for the design of thermally enhanced fabrics // *Thermochimica Acta*.— 2007, — Vol.452, — № 2, — P. 149–160.
191. Sercombe L., Veerati T., Moheimani F., Wu S.Y., Sood A.K., Hua S. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery // *Frontiers in Pharmacology*.— 2015, — Vol.6.
192. Shahidi F., Han X. Encapsulation of food ingredients // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.— 1993, — Vol.33, — № 6, — P. 501–547.
193. Sharma V., Vijay J., Ganesh M.R., Sundaramurthy A. Multilayer capsules encapsulating nimbin and doxorubicin for cancer chemo-photothermal therapy // *International Journal of Pharmaceutics*.— 2020, — Vol.582, — P. 119350.
194. Shchukin D.G., Gorin D.A., Möhwald H. Ultrasonically induced opening of polyelectrolyte microcontainers // *Langmuir*.— 2006, — Vol.22, — № 17, — P. 7400–7404.
195. Shchukin D.G., Shutava T., Shchukina E., Sukhorukov G.B., Lvov Y.M. Modified polyelectrolyte microcapsules as smart defense systems // *Chemistry of Materials*.— 2004, — Vol.16, — № 18, — P. 3446–3451.
196. She Z., Wang C., Li J., Sukhorukov G.B., Antipina M.N. Encapsulation of basic fibroblast growth factor by polyelectrolyte multilayer microcapsules and its controlled release for enhancing cell proliferation // *Biomacromolecules*.— 2012, — Vol.13, — № 7, — P. 2174–2180.
197. Shen H.-J., Shi H., Ma K., Xie M., Tang L.-L., Shen S., Li B., Wang X.-S., Jin Y. Polyelectrolyte capsules packaging BSA gels for pH-controlled drug loading and release and their antitumor activity // *Acta Biomaterialia*.— 2013, — Vol.9, — № 4, — P. 6123–6133.
198. Shenoy D.B., Antipov A.A., Sukhorukov G.B., Möhwald H. Layer-by-layer engineering of biocompatible, decomposable core-shell structures // *Biomacromolecules*.— 2003, — Vol.4, — № 2, — P. 265–272.
199. Shiratori S.S., Rubner M.F. pH-dependent thickness behavior of sequentially adsorbed layers of weak polyelectrolytes // *Macromolecules*.— 2000, — Vol.33, — № 11, — P. 4213–4219.
200. Singh B., Maharjan S., Park T.-E., Jiang T., Kang S.-K., Choi Y.-J., Cho C.-S. Tuning the buffering capacity of polyethylenimine with glycerol molecules for efficient gene delivery: staying in or out of the endosomes // *Macromolecular Bioscience*.— 2015, — Vol.15, — № 5, — P. 622–635.
201. Sivakumar S., Bansal V., Cortez C., Chong S.-F., Zelikin A.N., Caruso F. Degradable, surfactant-free, monodisperse polymer-encapsulated emulsions as anticancer drug carriers // *Advanced Materials*.— 2009, — Vol.21, — № 18, — P. 1820–1824.

202. Skirtach A.G., Antipov A.A., Shchukin D.G., Sukhorukov G.B. Remote activation of capsules containing Ag nanoparticles and Ir dye by laser light //Langmuir.— 2004, — Vol.20, — № 17, — P. 6988–6992.
203. Skirtach A.G., De Geest B.G., Mamedov A., Antipov A.A., Kotov N.A., Sukhorukov G.B. Ultrasound stimulated release and catalysis using polyelectrolyte multilayer capsules //J. Mater. Chem.— 2007, — Vol.17, — № 11, — P. 1050–1054.
204. Skirtach A.G., Karageorgiev P., Bédard M.F., Sukhorukov G.B., Möhwald H., Reversibly Permeable Nanomembranes Of Polymeric Microcapsules. //Journal Of The American Chemical Society.— 2008, — Vol.130, — № 35, — P. 11572–11573.
205. Skorb E. V., Fix D., Andreeva D. V., Möhwald H., Shchukin D.G. Surface-modified mesoporous SiO₂ containers for corrosion protection //Advanced Functional Materials.— 2009, — Vol.19, — № 15, — P. 2373–2379.
206. Skorb E.V., Sviridov D.V., Shchukin D.G. Light-controllable coatings for corrosion protection / In: Physics, chemistry and application of nanostructures— 2009. World Scientific, Pp. 515–518.
207. Sobel R., Versic R., Gaonkar A.G. Introduction to microencapsulation and controlled delivery in foods /In: Microencapsulation in the food industry— 2023. Elsevier, P. 1–9.
208. Soltwedel O., Ivanova O., Nestler P., Müller M., Köhler R., Helm C.A. Interdiffusion in polyelectrolyte multilayers //Macromolecules.— 2010, — Vol.43, — № 17, — P. 7288–7293.
209. Son S., Bai X., Lee S. Inorganic hollow nanoparticles and nanotubes in nanomedicinepart 2: Imaging, diagnostic, and therapeutic applications //Drug Discovery Today.— 2007, — Vol.12, — № 15–16, — P. 657–663.
210. Song X., Li H., Tong W., Gao C. Fabrication of triple-labeled polyelectrolyte microcapsules for localized ratiometric pH sensing //Journal of Colloid and Interface Science.— 2014, — Vol.416, — P. 252–257.
211. Such G.K., Johnston A.P.R., Caruso F. Engineered hydrogen-bonded polymer multilayers: from assembly to biomedical applications //Chemical Society Reviews.— 2011, — Vol.40, — № 1, — P. 19–29.
212. Sukhorukov G., Johannes S., Decher G. Reversible swelling of polyanion/polycation multilayer films in solutions of different ionic strength // Berichte der bunsengesellschaft für physikalische chemie.— 1996, — Vol.100, — № 6, — P. 948–953.
213. Sukhorukov G.B., Donath E., Davis S., Lichtenfeld H., Caruso F., Popov V.I., Möhwald H. Stepwise polyelectrolyte assembly on particle surfaces: A novel approach to colloid design //Polymers for Advanced Technologies.— 1998a, — Vol.9, — № 10–11, — P. 759–767.

214. Sukhorukov G.B., Donath E., Lichtenfeld H., Knippel E., Knippel M., Budde A., Möhwald H. Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles //Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.— 1998b, — Vol.137, — № 1–3, — P. 253–266.
215. Sukhorukov G.B., Rogach A.L., Garstka M., Springer S., Parak W.J., Muñoz-Javier A., Kreft O., Skirtach A.G., Susha A.S., Ramaye Y., Palankar R., Winterhalter M. Multifunctionalized polymer microcapsules: novel tools for biological and pharmacological applications //Small.— 2007, — Vol.3, — № 6, — P. 944–955.
216. Sukhorukov G.B., Volodkin D. V., Günther A.M., Petrov A.I., Shenoy D.B., Möhwald H. Porous calcium carbonate microparticles as templates for encapsulation of bioactive compounds //J. Mater. Chem.— 2004, — Vol.14, — № 14, — P. 2073–2081.
217. Sun T., Bernabini C., Morgan H. Single-colloidal particle impedance spectroscopy: complete equivalent circuit analysis of polyelectrolyte microcapsules //Langmuir.— 2010, — Vol.26, — № 6, — P. 3821–3828.
218. Szarpak A., Cui D., Dubreuil F., De Geest B.G., De Cock L.J., Picart C., Auzély-Velty R. Designing hyaluronic acid-based layer-by-layer capsules as a carrier for intracellular drug delivery //Biomacromolecules.— 2010, — Vol.11, — № 3, — P. 713–720.
219. Tam N.K.M., Uyen N.Q., Hong H.A., Duc L.H., Hoa T.T., Serra C.R., Henriques A.O., Cutting S.M.,. The Intestinal Life Cycle Of Bacillus Subtilis And Close Relatives. //Journal Of Bacteriology.— 2006, — Vol.188, — № 7, — P. 2692–2700.
220. Tanaka T., Ueda N. Патент WO2013100117a1. Microcapsule containing fungicidal active ingredient.— 2013.
221. Tang Q., Denton A.R. Ion density deviations in polyelectrolyte microcapsules: influence on biosensors //Physical Chemistry Chemical Physics.— 2014, — Vol.16, — № 38, — P. 20924–20931.
222. Tikhonenko S.A., Dubrovskii A.V., Kim A.L., Musin E. V. The new class of diagnostic systems based on polyelectrolyte microcapsules for urea detection / In: Macro-, Micro-, and Nano-biosensors.— 2021. Springer International Publishing, Cham, Pp. 225–237.
223. Tong W., Gao C., Möhwald H. Manipulating the properties of polyelectrolyte microcapsules by glutaraldehyde cross-linking //Chemistry of Materials.— 2005, — Vol.17, — № 18, — P. 4610–4616.
224. Trojanowska A., Giamberini M., Tsibranska I., Nowak M., Marciniak Ł., Jatrزاب R., Tylkowski B. Microencapsulation in food chemistry //Journal of membrane science and research.— 2017, — Vol.3, — P. 265–271.
225. Trubetskoy V.S., Loomis A., Hagstrom J.E., Budker V.G., Wolff J.A.,. Layer-By-Layer Deposition Of Oppositely Charged Polyelectrolytes On The Surface Of

- Condensed Dna Particles. //Nucleic Acids Research.— 1999, — Vol.27, — № 15, — P. 3090–3095.
226. Valle J.A.B., Valle R. De C.S.C., Bierhalz A.C.K., Bezerra F.M., Hernandez A.L., Lis Arias M.J. Chitosan microcapsules: methods of the production and use in the textile finishing //Journal of applied polymer science.— 2021, — Vol.138, — № 21, — P. 50482.
227. Vergaro V., Scarlino F., Bellomo C., Rinaldi R., Vergara D., Maffia M., Baldassarre F., Giannelli G., Zhang X., Lvov Y.M., Leporatti S. Drug-loaded polyelectrolyte microcapsules for sustained targeting of cancer cells //Advanced drug delivery reviews.— 2011, — Vol.63, — № 9, — P. 847–864.
228. Volodkin D. V., Petrov A.I., Prevot M., Sukhorukov G.B. Matrix polyelectrolyte microcapsules: new system for macromolecule encapsulation //Langmuir.— 2004, — Vol.20, — № 8, — P. 3398–3406.
229. Wang C., Ye S., Dai L., Liu X., Tong Z. Enzymatic desorption of layer-by-layer assembled multilayer films and effects on the release of encapsulated indomethacin microcrystals //Carbohydrate Research.— 2007, — Vol.342, — № 15, — P. 2237–2243.
230. Wang Z., Feng Z., Gao C. Stepwise assembly of the same polyelectrolytes using host–guest interaction to obtain microcapsules with multiresponsive properties // Chemistry of Materials.— 2008, — Vol.20, — № 13, — P. 4194–4199.
231. Wattendorf U., Kreft O., Textor M., Sukhorukov G.B., Merkle H.P. Stable stealth function for hollow polyelectrolyte microcapsules through a poly(ethylene glycol) grafted polyelectrolyte adlayer //Biomacromolecules.— 2008, — Vol.9, — № 1, — P. 100–108.
232. Xie A., Zhao S., Liu Z., Yue X., Shao J., Li M., Li Z. Polysaccharides, proteins, and their complex as microencapsulation carriers for delivery of probiotics: a review on carrier types and encapsulation techniques //International Journal of Biological Macromolecules.— 2023, — Vol.242, — P. 124784.
233. Yu A., Caruso F. Thin films of polyelectrolyte-encapsulated catalase microcrystals for biosensing //Analytical Chemistry.— 2003, — Vol.75, — № 13, — P. 3031–3037.
234. Yu F.-F., Zou H., Zhong Y.-Q. Research progress of layer-by-layer self-assembly technique in drug delivery //Yao Xue Xue Bao = Acta Pharmaceutica Sinica.— 2012, — Vol.47, — № 3, — P. 332–338.
235. Yu W., Chen Y., Mao Z. Hollow polyelectrolyte microcapsules as advanced drug Delivery Carriers. //Journal of Nanoscience and Nanotechnology.— 2016, — Vol.16, — № 6, — P. 5435–5446.
236. Yun J., Kim H.-I. Control of release characteristics in pH-sensitive Poly(Vinyl Alcohol)/Poly(Acrylic Acid) microcapsules containing chemically treated

- alumina core //Journal Of Applied Polymer Science.— 2010, — Vol.115, — № 3, — P. 1853–1858.
237. Yurinskaya M.M., Kochetkova O.Y., Shabarchina L.I., Antonova O.Y., Suslikov A.V., Evgen'ev M.B., Vinokurov M.G. Encapsulated Hsp70 decreases endotoxin-induced production of ROS and TNF α in human phagocytes //Cell Stress And Chaperones.— 2017, — Vol.22, — № 1, — P. 163–171.
238. Zakharian T.Y., Seryshev A., Sitharaman B., Gilbert B.E., Knight V., Wilson L.J. A fullerene–paclitaxel chemotherapeutic: synthesis, characterization, and study of biological activity in tissue culture //Journal of the American Chemical Society.— 2005, — Vol.127, — № 36, — P. 12508–12509.
239. Zelikin A.N., Becker A.L., Johnston A.P.R., Wark K.L., Turatti F., Caruso F. A general approach for DNA encapsulation in degradable polymer microcapsules //Acs Nano.— 2007, — Vol.1, — № 1, — P. 63–69.
240. Zelikin A.N., Li Q., Caruso F. Degradable polyelectrolyte capsules filled with oligonucleotide sequences //Angewandte Chemie International Edition.— 2006a, — Vol.45, — № 46, — P. 7743–7745.
241. Zelikin A.N., Quinn J.F., Caruso F. Disulfide cross-linked polymer capsules: en route to biodeconstructible systems //Biomacromolecules.— 2006b, — Vol.7, — № 1, — P. 27–30.
242. Zeng X., Danquah M.K., Zheng C., Potumarthi R., Chen X.D., Lu Y. NaCS–PDMAAC immobilized autotrophic cultivation of *Chlorella* sp. for wastewater nitrogen and phosphate removal //Chemical Engineering Journal.— 2012, — Vol.187, — P. 185–192.
243. Zhang X., Oulad-Abdelghani M., Zelkin A.N., Wang Y., Haïkel Y., Mainard D., Voegel J.-C., Caruso F., Benkirane-Jessel N. Poly(L-Lysine) nanostructured particles for gene delivery and hormone stimulation //Biomaterials.— 2010, — Vol.31, — № 7, — P. 1699–1706.
244. Zhang Y., Batys P., O'Neal J.T., Li F., Sammalkorpi M., Lutkenhaus J.L. Molecular origin of the glass transition in polyelectrolyte assemblies //Acs Central Science.— 2018, — Vol.4, — № 5, — P. 638–644.
245. Zheludkevich M.L., Shchukin D.G., Yasakau K.A., Möhwald H., Ferreira M.G.S. Anticorrosion coatings with self-healing effect based on nanocontainers impregnated with corrosion inhibitor //Chemistry of Materials.— 2007, — Vol.19, — № 3, — P. 402–411.
246. Zheng C., Ding Y., Liu X., Wu Y., Ge L. Highly magneto-responsive multilayer microcapsules for controlled release of insulin //International Journal of Pharmaceutics.— 2014, — Vol.475, — № 1–2, — P. 17–24.