

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
Химический факультет

На правах рукописи

Балабушевич Надежда Георгиевна

**МИКРОКАПСУЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ МАТРИЦ
И ПОСЛОЙНОЙ АДсорбции ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ**

1.5.6. - Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание учёной степени
доктора химических наук

Научный консультант:
доктор химических наук,
профессор Н.Л. Клячко

Москва – 2022

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений	6
ВВЕДЕНИЕ	8
I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1. Послойная адсорбция полиэлектролитов для капсулирования белков	16
1.1.1. Техника послойной адсорбции полиэлектролитов	16
1.1.2. Матрицы	18
1.1.3. Капсулирование белков	19
1.1.3.1. Включение белков в полиэлектролитные слои	20
1.1.3.2. Включение белков в готовые полиэлектролитные частицы	22
1.1.3.3. Включение белков в матрицы	23
1.1.4. Заключение по разделу 1.1.	24
1.2. Применение ватерита при капсулировании белков	24
1.2.1. Основные свойства ватерита	24
1.2.2. Включение белков в ватерит	26
1.2.3. Гибридные частицы ватерита	28
1.2.4. Биосовместимость частиц карбоната кальция	30
1.2.5. Заключение к разделу 1.2.	33
1.3. Роль, свойства и применение муцина. Мукозальная доставка белков	34
1.3.1. Биологическая роль муцина	34
1.3.2. Состав, строение и свойства муцина	36
1.3.3. Биомедицинское применение муцина	38
1.3.4. Мукозальная доставка	40
1.3.4.1. Особенности мукозальной доставки белков	40
1.3.4.2. Увеличение биодоступности белков при мукозальной доставке	42
1.3.4.2.1. Использование мукоадгезивных полимеров	42
1.3.4.2.2. Защита от протеолиза	43
1.3.4.2.3. Усиление проникновение через эпителий кишечника	46
1.3.5. Заключение к разделу 1.3.	48
1.4. Использование белок содержащих многослойных частиц	49
1.4.1. Перспективы использования полиэлектролитных частиц	49
1.4.2. Стимул-чувствительное высвобождение белков	50
1.4.3. Применение частиц для направленной доставки	54
1.4.4. Заключение к разделу 1.4.	55
1.5. Постановка задачи и обоснование объектов исследования	55

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	60
2.1. Материалы и реактивы	60
2.2. Получение и очистка препаратов	62
2.2.1. Получение очищенного муцина	62
2.2.2. Получение десиалированного муцина	62
2.2.3. Получение препаратов, меченных флуоресцентной меткой	62
2.3. Методы анализа микрочастиц	63
2.3.1. Световая оптическая микроскопия	63
2.3.2. Сканирующая электронная микроскопия	63
2.3.3. Конфокальная флуоресцентная сканирующая микроскопия	63
2.3.4. Рамановская спектроскопия	63
2.3.5. Динамическое светорассеяние	63
2.3.6. Круговой дихроизм	64
2.3.7. Рентгенофазовый анализ	64
2.3.8. Адсорбция-десорбция азота по методу Брунауэра-Эммета-Теллера	64
2.3.9. ИК-Фурье спектроскопия	64
2.4. Методы анализа отдельных веществ	65
2.4.1. Спектрофотометрическое определение	65
2.4.2. Аналитическая гель-хроматография	66
2.4.3. Определение активности белков	66
2.4.3.1. Определение активности трипсина	66
2.4.3.2. Определение активности α -химотрипсина	67
2.4.3.3. Определение активности ингибиторов протеаз	67
2.4.3.4. Определение активности лактоферрина	68
2.4.3.5. Определение активности каталазы	68
2.4.3.6. Определение активности пероксидазы	69
2.4.3.7. Определение активности глюкозооксидазы	69
2.4.3.8. Определение активности супероксиддисмутазы	70
2.5. Методы исследования	70
2.5.1. Изучение полиэлектролитные микрочастиц, полученных на нерастворимых матрицах с белком	70
2.5.1.1. Турбидиметрическое титрование белка полианионом	70
2.5.1.2. Получение микрочастиц на матрицах высолненного химотрипсина с использованием синтетических полиэлектролитов	71
2.5.1.3. Получение матриц с использованием высаливания белка	71

2.5.1.4. Получение нерастворимого комплекса (Белок-Полианион)	71
2.5.1.5. Послойная адсорбции полиэлектролитов на микроматрицах белка	71
2.5.1.6. Включение ингибиторов протеаз в микрочастицы	72
2.5.1.7. Высвобождение белка из микрочастиц	72
2.5.1.8. Анализ протеолитической деградациии инсулина	72
2.5.1.9. Определение связывания частицами ионов кальция	73
2.5.1.10. Определение связывания частицами муцина	73
2.5.2. Изучение полиэлектролитных микрокапсул, сформированных на меламинаформальдегидных микросферах	73
2.5.2.1. Получение микрокапсул с использованием декстрансульфата и протамина	73
2.5.2.2. Анализ взаимодействия белков с матричными капсулами	74
2.5.2.3. Включение биферментных систем в матричные капсулы	75
2.5.2.4. Визуализация активных ферментов в капсулах	75
2.5.2.5. Определение концентрации глюкозы с использованием биферментных систем	75
2.5.3. Изучение микрочастиц, сформированных на основе ватерита	75
2.5.3.1. Общая методика получения микросфер ватерита	75
2.5.3.2. Получение микросфер ватерита с сосажденными белками, муцином и доксорубицином	76
2.5.3.3. Получение микросфер ватерита с адсорбированными белками и муцином	76
2.5.3.4. Расчет констант адсорбционного равновесия белков	76
2.5.3.5. Методика получения полиэлектролитных капсул с белками с использованием микросфер ватерита	77
2.5.3.6. Высвобождение белков, муцина и доксорубицина из микросфер ватерита	77
2.5.3.7. Изучение стабильности ферментов, иммобилизованных на микросферах ватерита	78
2.5.4. Изучение действия препаратов <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	78
2.5.4.1. Взаимодействие микросфер ватерита с белками и клетками крови	78
2.5.4.1.1. Выделение клеток крови	78
2.5.4.1.2. Обработка микросфер ватерита альбумином и плазмой крови	79
2.5.4.1.3. Оценка лизиса эритроцитов	79
2.5.4.1.4. Оценка хемилюминесценции нейтрофилов	79
2.5.4.2. Изучение действия микрокапсулированного инсулина на лабораторных животных	80
2.5.4.2.1. Определение содержания глюкозы в крови	80
2.5.4.2.2. Определение содержания инсулина в плазме крови	80
2.5.4.2.3. Изучение на здоровых кроликах	80

2.5.4.2.4. Изучение на крысах с индуцированным диабетом	81
2.6. Расчёт результатов, достоверность и статистический анализ	82
III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	83
3.1. Микрокапсулирование послойной адсорбцией полиэлектролитов на нерастворимых матрицах, содержащих белок	83
3.1.1. Модельное микрокапсулирование на высоленных микроагрегатах химотрипсина с использованием синтетических полиэлектролитов	83
3.1.2. Микрокапсулирование с использованием биополиэлектролитов и их производных	87
3.1.2.1. Получение, характеристика и сравнение матриц, полученных с использованием высаливания и образования нерастворимого полиэлектролитного комплекса белка	87
3.1.2.2. Послойная адсорбция полиэлектролитов для получения стабильных микрочастиц с белком, чувствительных к изменению pH	92
3.1.3. Особенности микрокапсулирования белков с использованием декстрансульфата и хитозана	99
3.1.3.1. Микрокапсулирование белков с различными физико-химическими свойствами	99
3.1.3.2. Совместное микрокапсулирование белков	102
3.1.3.3. Мультифункциональные свойства полиэлектролитных микрочастиц с белками	104
3.1.3.3.1. pH-чувствительные свойства полиэлектролитных микрочастиц с белками	104
3.1.3.3.2. Мукоадгезивные свойства полиэлектролитных микрочастиц	108
3.1.3.3.3. Ca ²⁺ -связывающие свойства полиэлектролитных микрочастиц	109
3.1.3.3.4. Защитное действие полиэлектролитных микрочастиц	110
3.1.4. Принцип действия контейнеров в виде полиэлектролитных микрочастиц с белками при пероральном введении	112
3.1.5. Биологическое действие полиэлектролитных микрочастиц с инсулином <i>in vivo</i>	113
3.1.6. Выводы к разделу 3.1.	118
3.2. Микрокапсулирование белков в полиэлектролитные капсулы, полученные на основе растворимых матриц	120
3.2.1. Получение и характеристика мультислойных микрокапсул, полученных на растворимых матрицах	120
3.2.2. Особенности включения белков в готовые полиэлектролитные микрокапсулы	126
3.2.3. Функционирование биферментных систем в матричных полиэлектролитных микрокапсулах	130
3.2.4. Включение белков в мультислойные микрокапсулы путем предварительной загрузки в микросферы ватерита с помощью адсорбции и соосаждения	133
3.2.5. Выводы к разделу 3.2.	150

3.3. Применение муцина для микрокапсулирования белков	151
3.3.1. Включение муцина в микросферы ватерита	152
3.3.1.1. Адсорбция муцина на микросферах ватерита	152
3.3.1.2. Соосаждение муцина в микросферы ватерита	156
3.3.2.3. Использование муцина в послойной адсорбции полиэлектролитов	159
3.3.3. Гибридные микросферы ватерита с муцином	160
3.3.3.1. Влияние муцина на включение лекарственных веществ в гибридные микросферы	160
3.3.3.2. Иммобилизация ферментов в гибридные микросферы	163
3.3.4. Исследование цитотоксичности и биологической активности микросфер ватерита	167
3.3.4.1. Взаимодействие с белками крови	167
3.3.4.2. Лизис эритроцитов	169
3.3.4.3. Активация нейтрофилов	171
3.3.5. Выводы к разделу 3.3.	175
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	176
ВЫВОДЫ	178
Список литературы	180
Основные публикации по теме диссертации	208
Благодарности	214

Список сокращений

- А – человеческий сывороточный альбумин
АБТС – 2,2'-азино-бис (3-этилбензотиазолин-6-сульфо)новая кислота)
АКК – аморфный карбонат кальция
Алг – альгинат натрия
Апр – апротинин
БАВ – биологически активное вещество
БАПНА – N-бензоил-L-аргинина паранитроанилид
БАЭЭ – N-бензоил-L-аргинина этиловый эфир
БСА – бычий сывороточный альбумин
БТПНА – N-бензоил-L-тирозина паранитроанилид
БТЭЭ – N-бензоил-L-тирозина этиловый эфир
БЭТ – метод адсорбции-десорбции азота Брунауэра-Эммета-Теллера
ДЛС – динамическое светорассеяние
Докс – доксорубицин
ДС – декстрансульфат
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
ИББ – ингибитор Баумана-Бирк из сои
Инс – инсулин, Инс_{св} – инсулин свиньи, Инс_{чел} – инсулин человека
ИП – ингибитор протеаз
ИТК – ингибитор трипсина типа Кунитца из сои
Кат – каталаза
КД – круговой дихроизм
КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия
Люм – люминол
Люц – люцигенин
ЛФ – лактоферрин
М – муцин
МПО – миелопероксидаза
МФ – меламинформальдегид
НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
нПЭК – нерастворимый полиэлектrolитный комплекс
П – плазма крови
ПА – полианион
ПАА – поли (аллиламин гидрохлорид)

ПК – поликатион
ПКК – плотные контакты клеток эпителия
Пр – протамин
ПСС – поли(стиролсульфонат) натрия
ПЭГ – полиэтиленгликоль
ПЭК – полиэлектролитный комплекс
СД – степень деацетилирования
РФА – рентгенофазовый анализ
СОД – супероксиддисмутаза
СС – микросферы ватерита
СС-А – микросферы ватерита с сорбированным альбумином
СС-Кат – микросферы ватерита с сорбированной каталазой
СС-П – микросферы ватерита, обработанные плазмой крови
СС-Хим – микросферы ватерита с сорбированным химотрипсином
ССМ – гибридные микросферы ватерита с муцином
ССМ-А – гибридные микросферы ватерита ССМ с сорбированным альбумином
ССМ-Докс – гибридные микросферы ватерита ССМ с сорбированным доксорубицином
ССМ-Кат – гибридные микросферы ватерита ССМ с сорбированной каталазой
ССМ-П – гибридные микросферы ватерита с муцином, обработанные плазмой крови
ССМ-Хим – гибридные микросферы ватерита с муцином с сорбированным химотрипсином
СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
Трис – трис-(гидроксиметил)-метиламин
УЗ – ультразвук
ФИТЦ – флуоресцеин-5-изотиоцианат
Хим – химотрипсин
Хит – хитозан
ХС – хитозансульфат
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Развитие биотехнологии расширяет круг использования рекомбинантных белков и пептидов, что делает необходимым их микро- и нанокапсулирование для увеличения стабильности и повышения биодоступности в средствах доставки. При традиционных методах иммобилизации лабильных белков применение органических растворителей, сшивающих агентов и поверхностно-активных веществ часто приводит к существенной потере активности. В этой связи исследование, направленное на решение проблемы создания искусственных мультислойных полиэлектролитных структур с высоким сохранением активности капсулированных белков и ферментов, является актуальным.

Метод послойной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов (метод layer-by-layer (LbL) в англоязычной литературе), который первоначально был предложен в 1966 г. и возродился в начале 90-х годов

XX века, является унифицированным подходом для получения чередующихся монослоев заряженных макромолекул на различных поверхностях. Движущей силой формирования мультислоев кроме электростатических взаимодействий могут быть водородные и ковалентные связи, взаимодействия пар оснований (нуклеотидов) или «гость-хозяин», силы Ван-дер-Ваальса, что позволяет использовать в качестве полиэлектролитов разнообразные синтетические и природные полимеры, биологически активные вещества (БАВ), наночастицы, металлы и т.д. Начиная с 1998 г. полиэлектролитные слои были сформированы на частицах (матрицах), что открыло новую эпоху капсулирования БАВ. При нанесении полиэлектролитных слоев получали частицы «ядро-оболочка», а после полного или неполного разрушения матриц получали полые или заполненные (матриксные) капсулы. Были использованы матрицы различного размера, природы и строения. Большое распространение приобрели наноструктурированные, мезопористые сферы ватерита контролируемого размера, которые легко синтезируются и имеют развитую площадь поверхности. К недостаткам ватерита относятся низкая стабильность с перекристаллизацией в более термодинамически устойчивый кальцит и плохое включения положительно заряженных и низкомолекулярных веществ. Для устранения указанных проблем при образовании ватерита предложено добавлять полимеры с образованием частиц, получивших название «гибридные», которые отличаются стабильностью, еще большей площадью поверхности, меньшим размером пор и нанокристаллитов.

Применительно к белкам и полипептидам можно выделить три особенности капсулирования послойной адсорбцией полиэлектролитов в водных растворах и мягких условиях, которые вместе или порознь определяют успех приготовления частиц. Во-первых, белки благодаря амфотерной природе могут выполнять функцию поликатионов или полианионов, непосредственно участвующих в построении мультислоев. Во-вторых, возможно включение белков в заранее

приготовленные полиэлектролитные капсулы путем изменения проницаемости стенок частиц. В-третьих, белки используют для формирования матриц, на которые затем наносят полиэлектролитные слои.

Активно ведется поиск новых нано- и микроматриц с высоким содержанием белка, пригодных для послойной адсорбции полиэлектролитов, а также природных полимеров, способных придать новые свойства мультислойным капсулам.

В многочисленных исследованиях последних лет выявлена стимул-чувствительность полиэлектролитных микрокапсул с БАВ к воздействию химических, биологических и физических факторов, что вызвало огромный интерес к различным путям их использования. Особое внимание уделено биосовместимым и биodeградируемым микрочастицам, обладающим функциями депо и способным надежно защитить от агрессивных сред организма и пролонгировано выделить БАВ при достижении определенной кислотности среды, что особенно важно для разработки пероральных средств доставки белков.

Правильные подходы к выбору матриц, полиэлектролитов и их последовательности, условий и способа включения лабильных белков должны обеспечить получение стабильных мультислойных частиц, а также придать им многофункциональные свойства для увеличения биодоступности белковых препаратов при различных путях доставки.

Представленная работа обобщает результаты капсулирования белков и ферментов путем послойной адсорбции полиэлектролитов на различных матрицах. Развиваемые на протяжении 20 лет автором подходы к конструированию мультислойных частиц и созданию новых стабильных наноструктурированных матриц с новыми свойствами расширили фундаментальные представления об уникальных микросистемах и возможности их прикладного использования.

Степень разработанности темы исследования. По ситуации, предшествующей выполнению данного исследования, в литературе имелись отдельные примеры иммобилизации белков техникой послойной адсорбции полиэлектролитов на плоских поверхностях и твердых матрицах, отсутствовали системные исследования свойств мультислойных микрокапсул и сохранения активности белковых препаратов при включении в матрицы различной природы, полиэлектролитные слои и в готовые капсулы.

На момент начала представленной работы в качестве матриц с высоким содержанием белковых препаратов для послойной адсорбции полиэлектролитов были использованы только микрокристаллы белков и аморфные микрочастицы, сформированные изoeлектрическим осаждением, получить которые удалось только для отдельных белков (каталаза, инсулин), кроме этого не было проведено изучение свойств (рН-чувствительных, мукоадгезивных) мультислойных капсул, что определило бы возможность их практического применения.

Вопросы использования мультислойных частиц для доставки белков через слизистые оболочки (мукозальная доставка), выстилающие желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), носовую и ротовую полость не были освещены.

Биосовместимый, биodeградируемый, природный гликопротеин муцин, являющийся основным компонентом слизистых и способный придать дополнительный мукоадгезивный эффект препаратам, ранее для формирования гибридных микроматриц ватерита и мультислойных капсул не применялся.

Кроме этого, проблемы сохранения активности иммобилизованных лабильных ферментов при микрокапсулировании послойной адсорбцией полиэлектролитов на матрицах ватерита не были решены.

Цели и задачи исследования. Цели работы заключались в разработке направления, связанного с микрокапсулированием белков с помощью техники послойной адсорбции полиэлектролитов с использованием наноструктурированных матриц, и в развитии подходов к получению мультислойных рН-чувствительных контейнеров для доставки белков или стабильных биореакторов с высоким сохранением активности ферментов.

Для достижения поставленных целей потребовалось решить основные задачи:

1. Разработка подходов к капсулированию белков с использованием наноструктурированных микроматриц и техники послойной адсорбции полиэлектролитов. Анализ взаимосвязи свойств матриц, способов включения белка и строения мультислойных частиц с сохранением активности иммобилизованных препаратов.
2. Получение новых стабильных наноструктурированных микроматриц с высоким включением и содержанием белка, пригодных для послойной адсорбции полиэлектролитов.
3. Создание универсального способа нано- и микрокапсулирования путем послойной адсорбции полиэлектролитов на белоксодержащих микроматрицах, обеспечивающего высокое содержание и сохранение активности белка в мультислойных частицах и повышение биодоступности белка при мукозальной доставке.
4. Исследование закономерностей включения лабильных белков и ферментов в наноструктурированные микросферы ватерита и в мультислойные полиэлектролитные микрокапсулы.
5. Изучение возможности одновременного включения в полиэлектролитные частицы нескольких белков для создания мультиферментных систем или защиты от действия протеолитических ферментов.
6. Создание стратегии использования муцина для включения в микросферы ватерита и мультислойные микрокапсулы. Получение стабильных гибридных микросфер ватерита с муцином

и анализ возможности их использования для включения положительно заряженных и низкомолекулярных БАВ.

7. Изучение биологического действия гибридных микросфер ватерита и белоксодержащих мультислойных микрокапсул *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна работы состоит в выявлении взаимосвязи строения наноструктурированных мультислойных микросистем, свойств полиэлектролитов и способа включения белка с проявлением биологической активности белковых препаратов.

В работе впервые: получены с использованием высаливания и образования нерастворимых полиэлектролитных комплексов белка матрицы, пригодные для послойной адсорбции полиэлектролитов; применены белковые ингибиторы протеаз для создания мультислойных капсул и показано их защитное действие от протеолиза целевых белков; продемонстрировано *in vitro* и *in vivo* сочетанное воздействие мультифункциональных свойств полиэлектролитных микрочастиц на основные факторы, повышающие биодоступность белков при пероральной доставке; изучены различные способы иммобилизации в микрокапсулы лабильных ферментов для максимального сохранения их активности; исследованы свойства гибридных микросферы ватерита с муцином и их биосовместимость.

Исследование ускорило разработку мультислойных полиэлектролитных частиц с заранее заданными свойствами, перспективных для использования в химической энзимологии и биотехнологии (создание моно- и мультиферментных микрореакторов и белковых микроконтейнеров), в аналитической биохимии (разработка методов анализа, основанных на ферментативных реакциях в ограниченном объеме), в фармации (создание новых систем пролонгированной и направленной доставки лекарственных средств).

Теоретическая значимость работы. Предложенные в работе теоретические и экспериментальные подходы открыли возможности применения техники послойной адсорбции полиэлектролитов для микрокапсулирования белков и ферментов с высоким сохранением биологической активности.

С использованием новых белоксодержащих наноструктурированных матриц и послойной адсорбции полиэлектролитов разработаны контейнеры, обладающие рН-чувствительностью. По результатам изучения многофункциональных свойств микрокапсул, полученных на нерастворимых полиэлектролитных комплексах инсулина, предложен принцип действия мультислойных частиц с белками при пероральном введении.

Для мезопористых, наноструктурированных микросфер ватерита определены параметры равновесной адсорбции белков при загрузке с помощью адсорбции и соосаждения, обоснован механизм включения белков в частицы и их высвобождения, связанный с перекристаллизацией в кальцит.

Обнаруженное в работе влияние концентрации муцина при формировании гибридных микросфер ватерита на морфологию и свойства частиц, включение и пролонгированное высвобождение положительно заряженных белков и низкомолекулярных БАВ может быть использовано для создания новых комплексных лекарственных препаратов.

Практическая значимость работы. Новые подходы к микрокапсулированию белков с использованием наноструктурированных матриц и техники послойной адсорбции полиэлектролитов позволили получить частицы, имеющие перспективы применения в качестве средств доставки белковых препаратов и решения практических задач.

Для разработанных мультислойных микро- и наночастиц, сформированных на нерастворимых полиэлектролитных комплексах белка с полианионами, показано высокое содержание белка, стабильность при высушивании и хранении, рН-чувствительные, мукоадгезивные и защитные свойства от действия агрессивных сред и протеолиза. Совместное микрокапсулирование белковых ингибиторов протеаз в концентрации, не превышающей 2 - 3 % от массы препарата, позволило предотвратить или существенно уменьшить протеолиз целевых белков протеазами ЖКТ. Ограниченные испытания *in vivo* мультислойных частиц с инсулином при пероральном введении здоровым и диабетическим животным продемонстрировали проникновение гормона в кровь и гипогликемический эффект, что может быть важным для их использования в терапии диабета.

Включение оксидоредуктаз в матриксные мультислойные микрокапсулы позволило получить стабильные иммобилизованные мультиферментные системы, перспективные для аналитических целей, что было показано при анализе концентрации глюкозы.

Реализация подходов к капсулированию с использованием гибридных микросфер ватерита с муцином позволяет получить стабильные частицы с высоким включением положительно заряженных белков и высоким сохранением активности иммобилизованных ферментов, ценные, даже без нанесения полиэлектролитных слоев, для создания средств мукозальной доставки БАВ.

Методология и методы исследования. Выбор белков для капсулирования был обусловлен их востребованностью в качестве лекарственных средств или для решения практических задач. В работе для формирования мультислойных частиц использовали различные микроматрицы: новые в виде высоленных агрегатов и нерастворимых полиэлектролитных комплексов белков, известные наноструктурированные, мезопористые сферы ватерита и меламинформальдегидные сферы с высокой монодисперсностью. Для анализа частиц были задействованы современные методы микроскопии (световой, сканирующей электронной (СЭМ), конфокальной лазерной сканирующей (КЛСМ)), рентгенофазового анализа (РФА), адсорбции-десорбции азота по Брунауэру-Эммету-Теллеру (БЭТ), динамического лазерного светорассеяния (ДЛС) и т.д. Мукоадгезивные свойства частиц оценивали по адсорбции муцина. Для исследования белков и полимеров прибегали к

спектрофотометрическим (в том числе для оценки содержания хитозана с использованием ортофталлиевого альдегида), хроматографическим и иммуноферментному методам, круговому дихроизму (КД), ИК-спектроскопии. Определение активности ферментов и белковых ингибиторов протеаз осуществляли спектрофотометрическими методами. При изучении стабильности и защитных свойств полиэлектролитных частиц по отношению к капсулированным белкам моделировали среды ЖКТ, содержащие протеолитические ферменты. Для оценки биосовместимости и цитотоксичности частиц изучали взаимодействия с белками крови, лизис мембран эритроцитов и активацию нейтрофилов методами хемилюминесценции. Для выявления гипогликемического действия капсулированного инсулина проводили опыты *in vivo* с использованием здоровых кроликов и крыс со стрептозотонин индуцированным диабетом.

Положения, выносимые на защиту:

1. Применение новых эффективных подходов с использованием наноструктурированных микроматриц и техники послойной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов позволяет успешно капсулировать белки и ферменты с высоким сохранением биологической активности.
2. Физико-химические свойства белков, полимеров и матриц, состав и строение полиэлектролитных систем оказывают влияние на размер, стабильность и рН-чувствительность мультислойных микрочастиц, пролонгированное высвобождение белка.
3. Предложенная иммобилизация путем послойной адсорбции полиэлектролитов на микроматрицах, полученных высаливанием белка или образованием нерастворимых полиэлектролитных комплексов белка и последующей обработкой ультразвуком, является универсальным способом микро- и нанокапсулирования белков с различными физико-химическими свойствами, относящихся к различным классам.
4. Выявленные многофункциональные свойства мультислойных полиэлектролитных микрочастиц и дополнительное введение белковых ингибиторов протеаз обеспечивают повышение биодоступности капсулированных белков при пероральной (мукозальной) доставке.
5. Гипогликемическое действие мультислойных микрочастиц с инсулином, покрытых хитозаном, подтверждено при инъекционном и пероральном введении здоровым животным и животным с диабетом.
6. Иммобилизация белков в готовые мультислойные микрокапсулы позволяет получить высокоактивные мультиферментные системы. Предложенные эффективные и удобные пути включения белков в полиэлектролитные микрокапсулы, сформированные на основе наноструктурированных микросфер ватерита, позволяют достичь высокого содержания и максимального сохранения биологической активности рН-чувствительных белков и ферментов.

7. Природный биополимер муцин, являющийся основным компонентом всех слизистых, успешно использован в качестве полианиона при послойной адсорбции полиэлектролитов, в том числе для анализа мукоадгезивных свойств мультислойных частиц.

8. Наноструктурированные гибридные микросферы ватерита с муцином отличаются морфологией, более высоким включением и пролонгированным высвобождением положительно заряженных низкомолекулярных белков и БАВ, лучшими защитными свойствами для иммобилизованных ферментов, меньшим связыванием белков плазмы крови, отсутствием повреждения мембран эритроцитов и большей способностью стимулировать продукцию активных форм кислорода нейтрофилами по сравнению с контрольными микросферами ватерита.

Личный вклад диссертанта. Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его руководстве или непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование, постановку научных задач, проведении исследований, анализ полученных результатов, сбор и обработку данных, оформление результатов и подготовку к публикации. В работах, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается использованием в работе комплекса современных физико-химических методов исследования, применением при обработке и интерпретации результатов измерений стандартных и принятых в мировой научной практике методик и теоретических положений, воспроизводимостью полученных экспериментальных данных. Все эксперименты проводили в трех и более независимых повторах, а для анализа данных использовали адекватные и современные методы статистической обработки.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на 41-ой международных и российских конференциях: Международной научно-практической конференции «Фундаментальная наука для практической медицины-2021. Аддитивные технологии, современные материалы и физические методы в медицине. Актуальные вопросы» (Нальчик, 2021 г.); Международном форуме (Москва, 2020) и II, III, IV, VIII, IX Международных конгрессах «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2003, 2005, 2006, 2015, 2018 г.); 43 FEBS Congress (Прага, Чехия, 2018 г.); V научно-практической конференции "Наноматериалы и живые системы" (Казань, 2018 г.); International Conference «Biocatalysis: Fundamentals & applications» (Москва, 2015, 2017 г.); VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII Международных конференциях «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (Репино, 2003 г., Казань, 2006 г.; Ставрополь, 2008 г.; Нижний Новгород, 2010 г.; Мурманск, 2012 г.; Пермь, 2014 г.; Уфа, 2016 г.); XI Международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии» (Севастополь, 2016 г.); Международной научно-практической

конференция «Биотехнология и качество жизни» (Москва, 2014 г.); Российском симпозиуме с международным участием Биофарма-2009 «От науки к промышленности (Анталия, Турция, 2009 г.); III Международной конференции по коллоидной химии и физико-химической механике (Москва, 2008 г.); Pharmaceutical Sciences World Congress (Амстердам, Нидерланды, 2007 г.); XI, XII, XIII, XIV, XV International Workshop on Bioencapsulation (Иллкирх, Франция, 2003 г., Витория, Испания, 2004 г., Кингстон, Канада, 2005 г., Лозанна, Швейцария, 2006 г., Вена, Австрия, 2007 г.); IV Всероссийской Каргинской конференции «Наука о полимерах 21 века» (Москва, 2007 г.); V, VI Симпозиуме «Химия протеолитических ферментов» (Москва, 2002, 2007 г.); XXXIII Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (Вена, Австрия, 2006 г.); Pharmaceutical Sciences Fair & Exhibition (Ницца, Франция, 2005 г.); XII Российском национальном конгрессе "Человек и лекарство" (Москва, 2005 г.); European Conference on Drug Delivery and Pharmaceutical Technology (Севилья, Испания, 2004 г.); 30 Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (Глазго, Шотландия, 2003 г.); XIX congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis and 49 Annual SSC Meeting. (Бирмингем, Великобритания, 2003 г.); XVI Conference of the European Colloid and Interface Society (Париж, Франция, 2002 г.); COST 840 & X International BRG Workshop on Bioencapsulation (Прага, Чехия, 2002 г.); III Международной конференции «Химия высокоорганизованных веществ и научные основы нанотехнологии» (Санкт-Петербург, 2001 г.); XIII International Symposium on Microencapsulation (Анже, Франция, 2001 г.); IX International BRG Workshop and 62-th ICB Seminar «Bioencapsulation in Biomedical, Biotechnological and Industrial Applications» (Варшава, Польша, 2001г.); XXVIII International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials (Сан-Диего, США, 2001 г.).

Публикации. По материалам исследований опубликовано 46 статей в рецензируемых научных изданиях, из которых 39 статей в журналах, индексируемых в Web of Science, Scopus (17 в журналах 1-го квартиля, 12 в журналах 2-го квартиля, 10 в журналах 3 - 4 квартиля), и 5 статей в журналах, индексируемых РИНЦ, получен 1 патент.

Связь работы с государственными программами. Работа выполнена в рамках государственной регистрационной темы «Молекулярный дизайн, структурно-функциональный анализ и регуляция ферментных систем, клеточных конструкций, бионаноматериалов: фундаментальные основы и приложения в технологии, медицине, охране окружающей среды», грантов РФФИ 05-04-48747-а и 09-04-01431, участником которых был соискатель.

Структура и объем работы. Диссертационная работа построена по традиционной схеме, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 223 страницах, содержит 132 рисунка, 46 таблиц, 394 ссылки.

І. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. ПОСЛОЙНАЯ АДСОРБЦИЯ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ ДЛЯ КАПСУЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ

1.1.1. Техника послойной адсорбции полиэлектролитов

Метод послойной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов (метод layer-by-layer (LbL) в англоязычной литературе), который первоначально был предложен в 1966 г. [1] и возродился в начале 90-х годов XX века [2], является унифицированным подходом для получения чередующихся монослоев заряженных макромолекул на плоской поверхности (рис. 1.1).

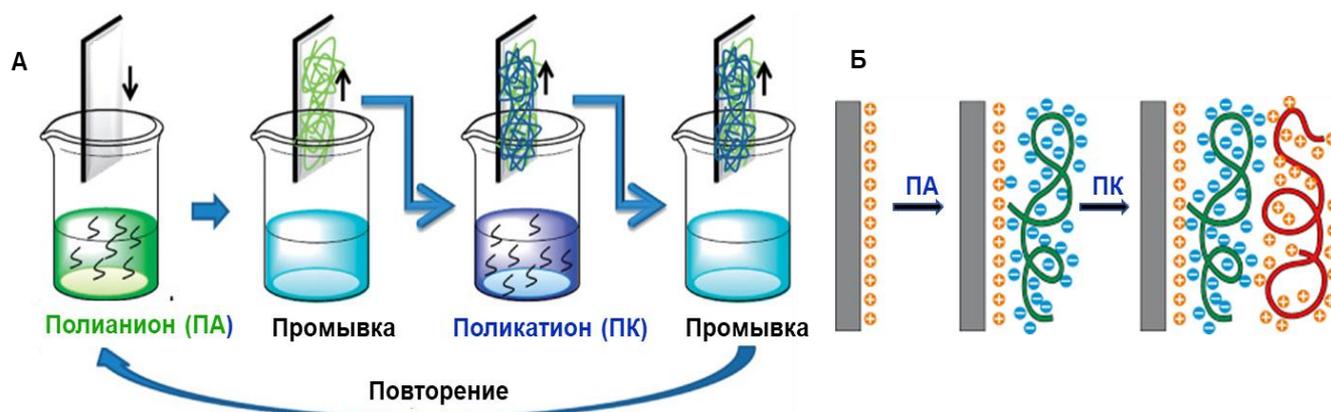


Рис. 1.1. Схема последовательной адсорбции полиэлектролитов на плоской подложке (для примера - положительно заряженной). А - процесс нанесения полиэлектролитов; Б - сборка полимерной мультислойной плёнки из разноименно заряженных полиэлектролитов. По материалам [3].

В основе процесса формирования лежат электростатические взаимодействия заряженной подложки с противоположно заряженными цепями, которые достигаются погружением подложки в раствор полиэлектролита (рис. 1.1 А). В результате электростатического взаимодействия заряды подложки (например, отрицательные) нейтрализуются с образованием монослоя полимера (поликатиона.(ПК)) (рис. 1.1 Б). Важно, что в результате действия стерического фактора добавление эквивалентного (по зарядам) количества цепей практически никогда не приводит к полной нейтрализации зарядов, зафиксированных на подложке на разном расстоянии друг от друга. Некоторые заряды подложки остаются не скомпенсированными, и для их нейтрализации необходимо вводить дополнительное число цепей. Таким образом, первая стадия адсорбции приводит к перезарядке поверхности и появлению на ней петель и хвостов, несущих избыточное количество зарядов. Перезарядка является движущей силой процесса, поскольку именно она обеспечивает вторую и последующие стадии формирования, когда подложку с адсорбированным

полиэлектролитом после промывания и удаления избыточного полимера погружают в раствор противоположно заряженного полиэлектролита. Чередующаяся многократная адсорбция обеспечивает образование стабильных полиэлектролитных мультислоев с различными свойствами, которые во многом определяются порядком и природой используемых разноименно заряженных синтетических и природных полимерных компонентов [3]. Техниклой послойной адсорбцией полиэлектролитов удается в мягких условиях, сравнительно просто и дешево, без специального оборудования формировать ультратонкие полиэлектролитные пленки толщиной от 1 до 100 нм [4]. Послойная адсорбция позволяет получать гомогенное покрытие с точной и предсказуемой архитектурой, применима к поверхностям любой формы и размера [5-8].

Последующие многочисленные исследования выявили, что движущей силой при получении мультислоев кроме электростатических взаимодействий [6, 8-10] могут быть водородные [7, 8] и ковалентные связи [11, 12], взаимодействия пар оснований (нуклеотидов) [13, 14] или «гость-хозяин» [15], силы Ван-дер-Ваальса [16-20]. Электростатические взаимодействия являются достаточно сильными для сдерживания полиэлектролитных слоев, но чувствительны к высокой ионной силе, экстремальным рН и полярным органическим растворителям [10]. Водородные связи расширяют возможности использования материалов за счет придания новых свойств, таких как реакция на изменение окружающей среды (рН, температура), формирование одно- или двухкомпонентных ультратонких гидрогелевых материалов и включение полимеров с низкой температурой стеклования внутрь ультратонких пленок. Для формирования водородных пленок использовали полярные и неполярные растворители, неионные полимеры (поливинилпирролидон, поливиниловый спирт, полиакриламид и полиэтиленоксид) и конъюгатные сополимеры [7]. Использование ковалентных взаимодействий позволяло получать мультислои стабильные при длительном воздействии полярных органических растворителей, низких и высоких значений рН [12]. Взаимодействия гость-хозяин использовали в супрамолекулярной химии. Типичным примером служило взаимодействие между β -циклодекстрином и его гостем [15]. Мультислойные пленки ДНК получали при взаимодействии пар оснований [14]. Было показано, что состав и последовательность олигонуклеотидов играет важную роль в структуре и формировании пленок ДНК. Взаимодействия Ван-дер-Ваальса позволяли получать капсулы, чувствительные к изменениям рН среды [18-20].

Разнообразие взаимодействий при послойной адсорбции полиэлектролитов позволило включать в мультислои не только различные водорастворимые синтетические полимеры, наиболее яркими представителями которых являются полистиролсульфонат (ПСС) и полиалилзамин (ПАА), но и белки [21-24], полисахариды [25], циклические вещества [26], металлы [23, 27], цвиттер-ионы [28], силикатные частицы [29], полупроводниковые частицы [30] и т.д.

1.1.2. Матрицы

Создание в 1998 г. полиэлектролитных оболочек на частицах (матрицах) различного состава, строения и размера (рис. 1.2) в 1998 г. положило начало новой эре капсулирования БАВ, в том числе белков и ферментов [31-33].

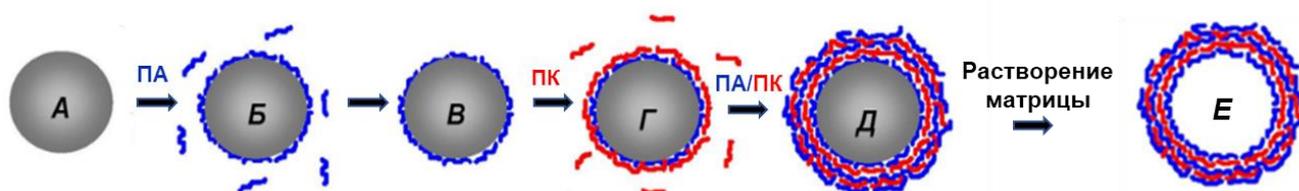


Рис. 1.2. Схема формирования оболочки на поверхности частицы методом послойной адсорбции полиэлектролитов (А - Д) и последующего удаления матрицы (Е). ПА - полианион, ПК - поликатион. По материалам [31].

Для послойной адсорбции полиэлектролитов использовали «мягкие» и «твердые» матрицы [34-36]. Среди «мягких» матриц применяли липосомы, везикулы, капли эмульсии, мицеллы, микро- и наногели, живые клетки [4, 35, 37-39]. Свойства наиболее распространенных «твердых» органических и неорганических матриц обобщены в табл. 1.1.

Таблица 1.1. Основные характеристики микроматриц, используемых для послойной адсорбции полиэлектролитов

Материал/ характеристика	Размер, мкм	Форма	Моно-дисперсность	Цена	Проблемы растворения	Разрушение	Ссылка
Меламин-формальдегид	0,3-10	Сферы	Отличная	Очень высокая	Механические повреждения, неполное растворение	0,1 М HCl	40
Полистирольный латекс	0,1-5	Сферы	Отличная	Средняя	Механические повреждения, неполное растворение	Тетра-гидрофуран	33
Диоксид кремния	0,03-100	Сферы	Очень хорошая	Низкая	Агрегация	HF	33
Сополимер молочной и гликолевой кислот	0,2-20	Сферы	Низкая	Низкая	Неполное растворение	1-метил-2-пирролидон	33
Карбонат кальция (ватерит)	0,2-50	Пористые сферы	Средняя	Очень низкая	Агрегация	pH<7/ ЭДТА	41
Фосфат кальция	0,04-10	Пористые сферы	Средняя	Очень низкая	Агрегация	pH<7/ ЭДТА	42

Жесткие условия разрушения обладающих отличной монодисперсностью и сферической формой частиц из диоксида кремния и меламинформальдегида, присутствие органических сред при растворении полистирольного латекса, а также низкая монодисперсность частиц на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот ограничивали возможность использования значительного числа матриц для биологических целей [40, 45]. Описаны матрицы в виде различных керамических нано- и микрочастиц, например, композиты из оксидов алюминия, цинка, кальция и фосфора или частицы из гидроксиапатита [42, 46]. Такие матрицы биodeградируемы, но их получение сложно и часто требует высоких температур. В качестве материала матриц также упоминались кристаллы органических и неорганических веществ [43, 44], золото [47], микроагрегаты ДНК [48] и т.д.

С 2001 г. особую популярность для послойной адсорбции полиэлектролитов приобрели неорганические частицы на основе карбонатов, в том числе наиболее активно полиморфная модификация карбоната кальция ватерит, размеры кристаллов которой можно варьировать от десятков нанометров до десятков микрометров [49-51]. Частицы карбоната кальция растворимы при $pH < 7,0$ обычно с использованием соляной или этилендиаминтетрауксусной (ЭДТА) кислот. Более подробно свойства ватеритных микросфер будут описаны в разделе 1.2.3 обзора литературы. Недавно в качестве матриц предложено использовать коммерческие микрочастицы природного карбоната кальция, поверхность которых активирована обработкой фосфорной кислотой [52, 53]. Функционализированные микрочастицы содержали до 29 - 50 % фосфатов кальция и характеризовались слоистой структурой, большой площадью поверхности (30 - 70 м²/г) и высокой пористостью (до 60 %).

1.1.3. Капсулирование белков

В многочисленных исследованиях техника послойной адсорбции полиэлектролитов использована для нано- и микрокапсулирования БАВ различной природы [35, 50, 54-62]. Подходы к капсулированию белков и пептидов отличаются тремя особенностями, которые вместе или порознь определяют успех приготовления частиц с контролируемой стабильностью (рис. 1.1).

Во-первых, белки в зависимости от их изоэлектрической точки могут выполнять функцию поликатионов или полианионов, непосредственно участвующих в построении мультислоев (рис. 1.3 А).

Во-вторых, возможно включение белков в готовые полиэлектролитные частицы путем изменения проницаемости стенок частиц (рис. 1.3 Б).

В-третьих, белки используют для формирования матриц, играющих роль подложки, на которых затем осуществляют послойную адсорбцию полиэлектролитов (рис. 1.3 В).

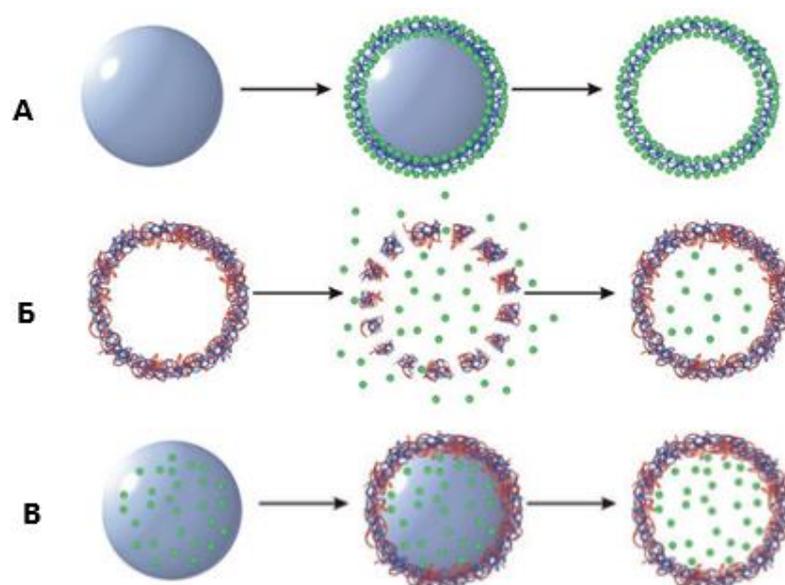


Рис. 1.3. Способы капсулирования белка с использованием послойной адсорбции полиэлектролитов: А - в полиэлектролитные слои; Б - в готовые полиэлектролитные частицы; В - в матрицы. Белки обозначены зеленым, полиэлектролиты - красным и синими цветом. Адаптировано [54].

Основными характеристиками процесса микрокапсулирования белка в полиэлектролитные частицы являются эффективность включения (loading efficiency, LE) и содержание (загрузка) белка в конечном продукте (loading capacity, LC). Эффективность включения определяется как процент включения белка в частицы от исходного количества, взятого для капсулирования, и является основной характеристикой процесса, а содержание белка в конечном продукте и сохранение биологической активности белка важны для последующего использования нано- и микрочастиц.

1.1.3.1. Включение белков в полиэлектролитные слои

Возможность включения белков и полипептидов в оболочку полиэлектролитных микрочастиц (рис. 1.3 А) определяется их амфотерной природой. Белки являются полиамфолитами благодаря наличию в их составе карбоксильных групп кислых аминокислот (аспарагиновой и глутаминовой) и азотсодержащих групп основных аминокислот (ω -аминогруппа лизина, амидиновый остаток аргинина и в несколько меньшей степени имидазольный остаток гистидина). При значениях pH ниже и выше изоэлектрической точки молекулы белка заряжены соответственно положительно и отрицательно, таким образом варьируя кислотность среды можно наделять белок функциями полианиона или поликатиона. Первоначально на различных плоских поверхностях были получены и исследованы мультислои водорастворимых белков (цитохром, лизоцим, гемоглобин, гистоны) и ферментов (глюкоамилаза, каталаза, глюкозооксидаза) в парах с синтетическими полиэлектролитами [63]. Позднее на коллоидных матрицах были успешно сформированы мультислои, состоящие из белков в паре с синтетическими и природными

полиэлектrolитами или только из белков [33, 64]. Для послойной адсорбции на коллоидных матрицах и планарных поверхностях описано использование более 40 глобулярных белков и 5 белков внеклеточного матрикса, из которых наиболее часто упоминались ацилаза, альбумины, амилазы, гемоглобин, гистоны, гликозидаза, глюкоамилаза, глюкозодегидрогеназа, глюкозооксидаза, глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа, глутатион редуктаза, желатин, иммуноглобулин G, инсулин, каталаза, кератин, коллаген, казеин, лакказа, лактат оксидаза, лактоферрин, ламинин, лизоцим, миоглобин, овальбумин, органофосфат гидролаза, пепсин, пероксидазы, полифенол оксидаза, протамин, рибонуклеаза, трипсин, уреазы, фибронектин, холинэстераза, холестерол оксидаза, щелочная фосфатаза, фактор роста фибробластов, фибронектин, цитохром [61, 64-70].

Для формирования мультислоев активно применяли полипептиды: отрицательно заряженные полиглутаминовую и полиаспарагиновую кислоты и положительно заряженные полиаргинин и полилизин, обладающие, однако, достаточно высокой токсичностью. Для устранения токсичности использовали генно-инженерный подход, позволяющий создавать новые полипептиды и белки с заданными свойствами. Так, были получены два эластиноподобных полипептида, содержащие повторяющуюся последовательность Val-Pro-Gly-Lys/Glu-Gly и остатков лизина и глутаминовой кислоты. На молекуле анионного полипептида E57 находились 57 отрицательных зарядов. Молекула катионного полипептида K48 несла 48 положительных зарядов и обладала на порядок более низкой токсичностью по сравнению с полилизином и полиаргинином [71].

Полученные с использованием послойной адсорбции полиэлектролитов частицы, получившие название «ядро-полиэлектролитная оболочка», могут быть использованы непосредственно. Например, на кристаллах гидрокортизона размером около 10 мкм были сформированы 5 - 10 бислоев инсулина и альгината [72]. При физиологическом значении pH 7,4 происходило постепенное и одновременное высвобождение из сформированных микрочастиц гормона и гидрокортизона, скорость которого падала с увеличением числа бислоев. Наиболее часто после нанесения полиэлектролитных слоев коллоидную матрицу разрушали. Если продукты разрушения представляли собой соединения небольшого размера, они проникали через полиэлектролитную оболочку и высвобождались в раствор. Таким путем получали «полые» микрокапсулы со стенками из полиэлектролитных мультислоев, которые сохраняли форму, задаваемую исходной матрицей. При неполном растворении матриц получали заполненные или «матриксные» микрокапсулы. Для улучшения механических свойств частиц полиэлектролитные оболочки часто химически фиксировали с помощью поперечно-сшивающих агентов [73-76]. Так при проведении послойной адсорбции гемоглобина и глюкозооксидазы на ядрах из карбоната марганца, каждый из пяти бислоев белков сшивали глутаровым альдегидом [75, 76]. После

растворения карбонатных ядер получали полые микрокапсулы, в которых оба фермента сохраняли активность.

Использование белков и полипептидов при формировании полиэлектролитных мультислоев получило широкое распространение как путь получения нано- и микрочастиц с различными БАВ. Сдерживающим фактором подхода являлось относительно невысокое содержание белка в готовых микрокапсулах, что уступало полиэлектролитным микрочастицам, сформированным двумя другими путями.

1.1.3.2. Включение белков в готовые полиэлектролитные частицы

Полиэлектролитные микро- и наночастицы получали с использованием разнообразных синтетических и природных полиэлектролитов различного строения и молекулярной массы. Синтетические полиэлектролиты, несмотря на их многочисленные преимущества (контролируемые состав и молекулярная масса, стабильность в широком диапазоне рН и ионной силы), как правило токсичны и имеют проблемы с биоразлагаемостью [77]. Хотя неоднократно отмечалось, что токсичность полимеров в составе полиэлектролитных комплексов уменьшается. Особый интерес для послойной адсорбции представляли природные полиэлектролиты, которые, однако, часто плохо очищены и трудно стандартизуемы. Биополимеры, как правило, чувствительны к изменениям окружающей среды, обладают биоразлагаемостью, биосовместимостью и мало токсичны, что особенно важно для создания средств доставки БАВ [78-80]. Среди природных полимеров наибольшее распространение получили альгинат, гепарин, гиалуроновая кислота, декстран, дубильные кислоты, каррагинан, пектин, целлюлоза, фукоидан, хондроитинсульфат, хитозан и т.д., а также их многочисленные производные (наиболее часто декстрансульфат, карбоксимеллцеллюлоза, карбоксиметилхитозан) [35]. Постоянно ведутся исследования по поиску новых полимеров и их возможных модификаций, пригодных для послойной адсорбции полиэлектролитов и придающих особые свойства мультислоевым частицам.

Включение белков в заранее приготовленные полиэлектролитные частицы и капсулы (рис. 1.3 Б) происходит путем сорбции и изменения проницаемости полиэлектролитной оболочки. Различают «открытое» и «закрытое» состояния микрокапсул, когда белки соответственно проникают или не проникают в частицы. Доступ белков в микрокапсулы регулируется изменением рН, ионной силы раствора, добавлением органических растворителей [81]. Для управления стабильностью и проницаемостью капсул активно использовали сшивку мультислоев с помощью глутарового альдегида [10]. С целью уплотнения стенок полые микрокапсулы нагревали, что способствовало разрушению электростатических связей между противоположно заряженными группами полиэлектролитов оболочки и делало полимерные цепи более подвижными [82, 83]. При получении дополнительной степени свободы полиэлектролитная система стремилась к состоянию

с минимумом энтропии, которому соответствует конформация полимерной цепи в виде гауссова клубка, что вызывало сжатие полимерной оболочки. Термообработка полых капсул, сформированных на ватеритных микросферах послойной адсорбцией декстрансульфата и полиаргинина, позволила существенно уменьшить диаметр частиц и увеличить толщину стенки.

В полых капсулах, полученных при полном растворении матриц, до 90 % белка включалось в полиэлектролитные стенки и только 10 % оставалось внутри частиц [84, 85]. В матричных микрокапсулах, полученных растворением матриц, содержащих высокомолекулярные полимеры, не способные проникнуть через полиэлектролитную оболочку, белки распределялись по всему объему частиц. Эффективность включения и содержание белка в матричных микрокапсулах была выше, чем в полых [86].

Например, полые микрокапсулы получали формированием семи бислоев высокомолекулярных хитозана и декстрансульфата на частицах кремнезема диаметром 3 мкм с последующим растворением матрицы плавиковой кислотой [87]. В микрокапсулы при нейтральных значениях рН включали рекомбинантный основной фактор роста фибробластов. В кислых средах при $\text{pH} < 6,4$ капсулы закрывались, предотвращая выделение фактора роста. В нейтральной среде за первый час из микрокапсул высвобождалось около 30 % белка. Затем выделение замедлялось, и за последующие 70 ч высвобождалось 80 % белка. В частности, матричные микрокапсулы изготавливали послойной адсорбцией полилизина и хондроитинсульфата на микросферах ватерита, сформированных в присутствии хондроитинсульфата, с последующим сшиванием стенок глутаровым альдегидом и растворением CaCO_3 , в процессе которого высокомолекулярный полисахарид не высвобождался из частиц [86]. Включение альбумина проводили инкубацией микрокапсул в концентрированных растворах белка при рН 3 - 5. Концентрация белка внутри частиц достигала 5,5 мг/мл. Высвобождение белка из микрокапсул происходило достаточно эффективно в течение первых 0,5 - 1,0 ч, возрастая с увеличением рН до 7,4, а затем замедлялось, выходя на плато (16 - 80 ч).

1.1.3.3. Включение белков в матрицы

Включение белков определялось природой и структурой выбранной матрицы (рис 1.3 В). Особый интерес для послойной адсорбции полиэлектролитов представляли матрицы с высоким содержанием белка, в том числе непосредственно состоящие из белков, например, кристаллы белков или аморфные частицы, полученные при осаждении белков в изоэлектрической точке [43, 88-90].

После послойной адсорбции синтетических полиэлектролитов ПСС и ПАА на кристаллы каталазы мультислойная оболочка защищала белок от воздействия протеаз, а фермент проявлял активность [43]. При нанесении на кристаллы инсулина 4 - 15 бислоев полилизина и альгината получали частицы неправильной формы размером 5 - 20 мкм [90]. При рН 7,4 инсулин из таких

частиц высвобождался медленнее, чем из непокрытых микрокристаллов гормона, а высвобождение регулировалось числом слоев. После осаждения инсулина в изоэлектрической точке в присутствии полиэтиленгликоля проводили сорбцию 5 бислоев хитозана и гепарина и обработку ультразвуком. Получали частицы размером около 1 мкм, стабильные при pH 4 - 5 и высвобождающие гормон в кислых условиях [91].

Ограничением для описанного метода формирования микроматриц стало малое количество белков, способных к кристаллизации и осаждению, что нашло отражение в сравнительно небольшом числе работ по этой тематике.

Начиная с 2004 г., огромное внимание уделялось получению белоксодержащих микроматриц на основе различных пористых карбонатных микросфер [41, 92], особенности использования которых рассмотрены в разделе 1.2. на примере ватерита.

1.1.4. Заключение к разделу 1.1.

Послойная адсорбция полиэлектролитов, проводимая в водных растворах в мягких условиях, благодаря широким возможностям варьирования матриц, полимеров, их последовательности и числа слоев позволяет успешно проводить капсулирование белков. Выбор матриц позволяет получать полые и матриксные капсулы от нано- до микроразмера. Особый интерес представляют наноструктурированные матрицы

Белки, ферменты и пептиды, благодаря амфотерной природе, при капсулировании с использованием послойной адсорбцией включают тремя способами: в мультислой, в матрицы или в готовые капсулы. Загрузка белковых препаратов и их содержание в капсулах зависит от способа включения. Капсулированные белки могут быть целевым веществом или структурным компонентом носителя.

Полиэлектролитные частицы и микрокапсулы с иммобилизованными белками и ферментами могут применяться как биореакторы различного назначения, а при использовании биополимеров как многофункциональные контейнеры, перспективные для доставки БАВ.

Несмотря на разнообразие материалов, использованных для послойной адсорбции, продолжается активный поиск новых нано- и микроматриц, синтетических и природных полимеров и рекомбинантных белковых препаратов для получения стабильных полиэлектролитных частиц различного назначения и придания им особых свойств.

1.2. Применение ватерита при капсулировании белков

1.2.1. Основные свойства ватерита

Карбонат кальция имеет три кристаллические полиморфные модификации: ватерит, кальцит, арагонит, которые образуются из аморфного карбоната кальция (АКК). Эти полиморфные модификации существенно различаются формой кристаллов, термодинамической стабильностью, средним размером, площадью поверхности и растворимостью (табл. 1.2).

Кристаллы кальцита имеют кубическую форму, арагонита - игольчатую, а ватерита - преимущественно сферическую с высоко пористой структурой (рис. 1.4).

Таблица 1.2. Характеристика полиморфных модификаций карбоната кальция [93]

Полиморфная модификация	Форма	Размер, мкм	Плотность, г/см ³	Произведение растворимости, М	Площадь поверхности, м ² /г
АКК	Сферическая	0,03 - 0,4	2,43	$4,0 - 9,1 \cdot 10^{-7}$	9,0 - 43,0
Арагонит	Игольчатая	длина 2 - 30; ширина 3 - 4	2,93 - 2,95	$1,7 - 6,0 \cdot 10^{-9}$	1,2 - 3,6
Кальцит	Кубическая	2 - 20	2,71	$1,3 - 12,2 \cdot 10^{-9}$	0,19 - 0,99
Ватерит	Сферическая	0,3 - 70	2,54 - 2,65	$1,2 \cdot 10^{-8}$	7,2 - 40,0

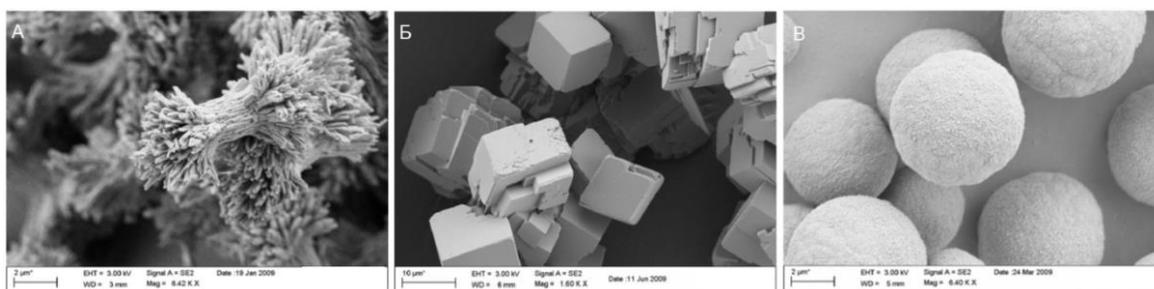


Рис. 1.4. СЭМ фотографии полиморфных форм карбоната кальция: арагонита (А), кальцита (Б), ватерита (В) [93].

Образование определенной полиморфной модификации зависит от условий, но в первую очередь от температуры (рис. 1.5). Кристаллы ватерита зарождаются и растут из АКК в диапазоне температур от 25 до 50°C, арагонит преимущественно образуется при повышенных, а кальцит – при низких температурах [93].

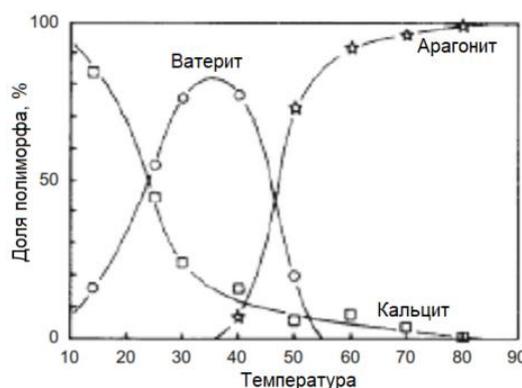


Рис. 1.5. Зависимость полиморфного состава карбоната кальция от температуры. Адаптировано из [92].

По сравнению с другими полиморфными формами ватерит обладает идеальными свойствами для включения БАВ, в том числе белков [41]. Ватерит легко получается, имеет низкую себестоимость (0,2–0,4 \$/г), низкую полидисперсность ($\leq 25\%$), контролируемый размер частиц от

нано- до десятков микрометров, развитую площадь поверхности ($\geq 6 \text{ м}^2/\text{г}$), высокую пористость, мезопористую внутреннюю структуру (средний диаметр пор 20 - 35 нм), а также характеризуется биоразлагаемостью, биосовместимостью, низкой токсичностью [41]. Недостатками ватерита является низкая стабильность и быстрая перекристаллизация в более стабильную полиморфную модификацию кальцит (рис. 1.6) [94].



Рис. 1.6. Влияние среды и времени на перекристаллизацию ватерита. Адаптировано из [94].

Обычно для получения ватерита используют три метода: 1) карбонизации с пропуском CO_2 через пересыщенный раствор $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ или $\text{Ca}(\text{OH})_2$; 2) обратной эмульсии; 3) спонтанной кристаллизации [57]. Наибольшее распространение получила спонтанная кристаллизация, удобная для регулирования размера и морфологии частиц, а также для включения различных веществ [9, 57, 95-97]. Быстрое осаждение при смешивании двух концентрированных растворов, содержащих ионы Ca^{2+} и CO_3^{2-} , приводит к образованию желеподобного осадка аморфного карбоната кальция, трансформирующегося в другие полиморфные формы CaCO_3 , содержание которых контролируется скоростями зародышеобразования и роста [98]. В отличие от кальцита и арагонита, ватерит кристаллизуется преимущественно в виде пористых сфер, состоящих из отдельных нанокристаллитов [99].

Заряд кристаллов ватерита зависит от состава и pH окружающего раствора и обычно варьирует от слабо положительных до слабо отрицательных значений [41]. Например, ζ -потенциал частиц ватерита был отрицательный при диспергировании в насыщенном растворе CaCO_3 при pH 9,0 (- 4 мВ) и pH 10,6 (- 26 мВ), а в растворах 0,01 М CaCl_2 , 0,002 М Na_2CO_3 и 0,5 М NaCl заряд частиц ватерита оказывался положительным в диапазоне pH 7,5 - 9,9 [97].

1.2.2. Включение белков в ватерит

Белки включали в пористые сферы ватерита двумя основными способами: адсорбцией на поверхности готовых частиц или соосаждением белка при формировании частиц (рис. 1.7). Меньшее распространение получила загрузка с использованием изоэлектрического осаждения

белков [41], упаривания в среде органических растворителей [100], сочетания адсорбции и центрифугирования [102] или процессов замораживания - оттаивания [101].



Рис. 1.7. Основные способы включения БАВ в микросферы ватерита. Адаптировано из [41].

При включении адсорбцией микросферы ватерита инкубировали с растворами белка. Физическая сорбция в микросферы ватерита определялась сродством молекул белка к поверхности микросфер и диффузионными затруднениями при проникновении молекул в поры частиц [9]. Большая площадь поверхности, наличие мезопор и каналов во внутренней структуре позволяет микросферам ватерита адсорбировать молекулы белков с достаточно высокой эффективностью включения [9, 21 41, 50, 102, 103]. При адсорбции белков электростатические силы играют значительную роль. Включение сорбированного белка значительно увеличивалось, если заряды молекул белка и сфер ватерита были противоположными [50, 92, 104]. Загрузка белков зависела от их молекулярной массы и росла с увеличением концентрации белка, составляя 0,5 - 2 пкг белка на микросферу ватерита диаметром около 5 мкм [41, 92]. При последующей послойной адсорбции полиэлектролитов наблюдались значительные потери белка, достигающие до 30 % при нанесении первого бислоя, 10 % при нанесении второго бислоя и 4 % при растворении матриц. В готовых мультислойных микрокапсулах оставалось не более 30 - 50 % сорбированного белка.

Соосаждение в процессе формирования сфер ватерита, когда белок предварительно добавляли к раствору одной из солей, позволило в десятки раз увеличить включение, а белок равномерно распределялся по объему частиц [92]. Например, количество соосажденного бычьего сывороточного альбумина достигало 10 % от массы микросфер ватерита, а концентрация белка внутри сфер достигала сотен мг/мл. Включение больших молекул белка возможно при физическом захвате в поры при формировании сфер ватерита. Включение малых молекул белков и пептидов было проблематично из-за их свободной диффузии из частиц ватерита сквозь поры.

Соосаждение белков, как и других полимеров, могло оказывать влияние на кинетику роста, морфологию и размер частиц ватерита, а также вызывать образование других полиморфных форм карбоната кальция [57, 95, 105-106]. Заряд микросфер ватерита определялся зарядом включенного

белка при определенном значении рН. В микросферы ватерита сосаждали как отдельные белки и ферменты, так и несколько ферментов одновременно [107]. Соосаждением трипсина (24 кДа, рI 10,5) удалось получить пористые сферы диаметром 800 нм с площадью поверхности 12,9 м²/г и средним размером пор 29,7 нм [108]. Эффективность включения трипсина в частицы составила 11,5 %. Имобилизация фермента позволила повысить термостабильность и устойчивость к органическим веществам, многократно использовать частицы. Соосаждением пепсина формировали микросферы размером 2 - 3 мкм [109]. По данным ИК-спектроскопии в результате имобилизации в пепсине в 10 раз уменьшалось содержание α -спиралей и рандомных структур, а содержание β -листов увеличивалось.

На включение белков в микросферы ватерита существенное влияние оказывали диаметр частиц и размер пор [110]. Как правило, с уменьшением размера частиц эффективность включения белковых препаратов возрастала [51, 110]. Размеры частиц и пор изменяли, варьируя условия получения частиц (концентрации и соотношения солей, скорость перемешивания, температура) или добавляя низкомолекулярные полиолы [111-113].

Дополнительное введение различных полимеров при формировании ватерита позволяло изменять структуру, свойства и стабильность микросфер, увеличить включение и плохое удерживание низкомолекулярных и положительно заряженных веществ, что позволило называть такие частицы «гибридными».

1.2.3. Гибридные частицы ватерита

Для стабилизации ватеритной модификации использовали различные полимеры, содержащие гидроксильные и аминогруппы, благодаря которым обеспечивались взаимодействия с ионами Ca²⁺ [114]. Сводные данные по получению и свойствам гибридных частиц с различными биополимерами приведены в табл. 1.3.

Целлюлозу и ее производные (карбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу) сосаждали в частицы карбоната кальция, которые дополнительно обрабатывали ультразвуком [118-120]. В отсутствие целлюлозы формировалась смесь частиц ватерита и кальцита размером 721 нм. При концентрации полимера до 0,5 мг/мл содержание кальцита и размер частиц уменьшались. При увеличении концентрации целлюлозы до 8 мг/мл получали сферы ватерита размером 206 нм, имеющие отрицательный поверхностный заряд -35 мВ, площадь поверхности 76,5 м²/г и средний размер пор 2,4 нм. Гибридные частицы использовали для включения гемоглобина (64,5 кДа, рI 6,8), с ростом концентрации которого до 3,0 мг/мл содержание белка достигало 183,6 мг/г препарата [118]. При соосаждении карбоксиметилцеллюлозы формировали сферы диаметром 1 мкм с каналобразными порами [119]. Гибридные частицы имели отрицательный заряд поверхности, что способствовало лучшему включению положительно заряженного лизоцима (15 кДа, рI 11,3). При использовании мгновенного наноосаждения

гидроксипропилметилцеллюлозы формировали частицы ватерита размером 0,8 - 1,6 мкм с узким распределением по размерам [120].

Таблица 1.3. Характеристика гибридных частиц ватерита с соосаженными биополимерами и их модификациями

Полимер	Способ получения частиц	Средний размер частиц, мкм	Характеристика частиц	Включаемое БАВ	Ссылка
Хитозан 15 кДа	карбонизация	0,166	площадь поверхности 123 м ² /г, объем пор 0,35 м ³ /г, размер пор 12 нм	-	[28]
Олигохитозан	спонтанная кристаллизация	2,3	-	-	[115]
Карбокси-метилхитозан	спонтанная кристаллизация	0,5-5	-	доксорубин	[116]
Альгинат	спонтанная кристаллизация	5	площадь поверхности 75 м ² /г, объем пор 0,25 м ³ /г, размер пор 13 нм	левофлаксацин	[117]
Целлюлоза	спонтанная кристаллизация	0,721	площадь поверхности 76 м ² /г, объем пор 0,212 м ³ /г, размер пор 2,4 нм	гемоглобин	[118]
Карбокси-метил-целлюлоза	спонтанная кристаллизация	1	-	лизоцим	[119]
Гидрокси-пропилметил-целлюлоза	спонтанная кристаллизация	0,8-1,6	-	-	[120]
Гепарин	спонтанная кристаллизация	4,1	площадь поверхности 36,3 м ² /г, размер пор 15 нм	лизоцим	[121, 122]
Гиалуроновая кислота	карбонизация	5,45	-	-	[123]
Цикло-декстрин	карбонизация	3-5	площадь поверхности 4,5 м ² /г, объем пор 0,049 м ³ /г, размер пор 44 нм	нильский красный, кумарин	[124]
Декстран-сульфат	спонтанная кристаллизация, адсорбция	1-3	-	терапевтические пептиды, нейропептиды	[100, 125- 127]

Функционализированные микросферы ватерита получали включением альгината, связывающего ионы Ca²⁺ с образованием гидрогелей [100, 117, 128, 129]. Наличие сорбированного альгината позволило увеличить эффективность включения в частицы альбумина и овальбумина, а также уменьшить их потери при послойной адсорбции 3 - 5 бислоев полилизина и альгината [128, 129]. После растворения карбонатной матрицы в кислых средах гель альгината кальция оставался

внутри микрокапсул, препятствуя высвобождению белка. Для овальбумина эффективность включения составляла 70 % при его содержании около 55 % от массы матричных полиэлектролитных капсул [128]. Для альбумина концентрация внутри микрокапсул достигала 100 мг/мл [129].

Для создания гибридных частиц использовали низкомолекулярный хитозан 15 кДа, модифицированный янтарным ангидридом [28], олигохитозан (≤ 5 кДа) [115] и карбоксиметилхитозан [116]. Размер сфер с низкомолекулярным хитозаном составлял 166 нм и был в 2 раза больше размера контрольных кристаллов ватерита [28]. При увеличении концентрации олигохитозана (1 - 10 мг/мл) существенно возрастала стабильность ватерита и уменьшался размер нанокристаллитов [115]. Варьированием концентрации карбоксиметилхитозана регулировали размер частиц от 500 нм до 5 мкм [116].

Подробно исследовали влияние концентрации соосажденного гепарина 15 кДа на морфологию и свойства ватеритных частиц [121, 122]. Присутствие биополимера в концентрации 0,1 - 5 мг/мл не изменяло диаметр микросфер, равный 4,1 мкм, но существенно влияло на площадь поверхности и размер пор. С увеличением концентрации гепарина площадь поверхности увеличивалась с 6,8 до 36,3 м²/г, диаметр пор уменьшался с 35 до 15 нм, а поверхностный заряд частиц достигал -45 мВ [121]. Эффективность включения лизицима (15 кДа, рI 11,3) при адсорбции на гибридных частицах линейно увеличивалась с ростом концентрации гепарина, что объясняли электростатическими взаимодействиями полианиона и белка при значениях рН ниже его изоэлектрической точки. При рН среды близком к рI лизоцима решающую роль при включении белка играли гидрофобные взаимодействия.

Упомянулось получение гибридных частиц ватерита с использованием гиалуроновой кислоты 600 кДа [123], циклодекстринов [124] декстрансульфата 9 - 20 кДа [100, 125, 126], полидофамина [130, 131], магнитных частиц [132] и т.д.

Следует заметить, что гибридные формы ватерита с различными полимерами оказались перспективными не только в качестве матрицы для получения капсул с помощью послойной адсорбции полиэлектролитов, но, благодаря стабильности и особым свойствам, рекомендованы для непосредственного использования в качестве носителей БАВ, что делает важным дополнительное изучение их поведения в биологических системах [133].

1.2.4. Биосовместимость частиц карбоната кальция

Препараты карбоната кальция одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration (FDA), раздел 331.11b) в качестве лекарственного препарата при лечении кислотозависимых заболеваний ЖКТ (антацид) (раздел 331.11b), диарей и в виде средства для контроля веса (раздел 310.545).

Биосовместимость частиц карбоната кальция оценивали по отношению к различным клеточным линиям (hBM-MSC [134], J774A.1[135], MG-63 [136]), а также анализировали взаимодействия с компонентами плазмы (фосфатами [137], белками [134, 138]) и основными форменными элементами крови (эритроцитами [134] и нейтрофилами [139]).

Благодаря наличию фосфат-ионов в плазме крови может происходить перекристаллизация ватерита в макропористые структуры CaHPO_4 [137]. В плазме микросферы ватерита диаметром 1 - 3 мкм превращались в структуры с рыхлым строением размером менее 1 мкм. По данным энергодисперсионной спектроскопии с увеличением времени инкубации содержание фосфора в таких частицах увеличивалось, что свидетельствовало о протекании реакции ионного обмена между карбонатными и фосфатными ионами. При инъекции микросфер ватерита в бедренную мышцу крыс в области введения наблюдали перекристаллизацию в арагонит. В течение двух недель частицы постепенно исчезали из мышечной ткани за счет биорезорбции, а воспаление в области инъекции отсутствовало.

Плазма крови содержит около 100 различных белков, из которых альбумин (67 кДа, рI 4,7) имеет самую высокую концентрацию (30 - 40 мг/мл). Адсорбция альбумина на ватерите достигала 40 мг/г и была существенно выше, чем на кальците или фосфате кальция (около 7 и 5 мг/г соответственно) [138]. Взаимодействие нано- и микрочастиц ватерита с белками крови приводило к образованию на них белковой короны, способствующей лучшему поглощению частиц клетками и выведению из организма [134].

Эритроциты являются самыми многочисленными из форменных элементов крови (размер 7-10 мкм, ζ -потенциал $-31,8 \pm 1,1$ мВ [140]) и содержат железосодержащий белок гемоглобин (68 кДа, рI 6,8). Биосовместимость гибридных наночастиц карбоната кальция с сульфатом гентамицина (размер 113 нм, дзета-потенциал $-10,2$ мВ) была оценена путем анализа лизиса эритроцитов и скорости их оседания [134]. С увеличением концентрации ватеритных частиц гемолитическая активность росла до 6 %.

Полиморфоядерные нейтрофилы (размер 6 - 20 мкм, отрицательный заряд поверхности [141]), представляющие разновидность лейкоцитов, обладают способностью к фагоцитозу, образованию активных форм кислорода и синтезу бактерицидных веществ (гипохлорита, лизоцима, лактоферрина). Под их активацией понимают изменения физиологической и биохимической активности клеток при внешнем воздействии. При контакте нейтрофилов с чужеродными объектами, в том числе с бактериями или частицами, в реакции, катализируемой ферментом миелопероксидазой (МПО, 150 кДа, рI 9,2), образуется гипохлорит (OCl^-) [142]:



Активация рецепторов на поверхности клеток запускает процесс сборки элементов НАДФН-оксидазного комплекса и усиленное образование НАДФН в нейтрофилах (рис. 1.8), а затем резкое потребление кислорода и образование супероксидного анион радикала $O_2^{\cdot-}$:



В присутствии антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы супероксидный анион радикал превращается в пероксид, который служит субстратом МПО.

Прямой химический анализ образующихся активных форм кислорода невозможен, ввиду их повышенной реакционной активности, поэтому их определяют с помощью метода хемилюминесценции (ХЛ) (рис. 1.8): продукцию супероксидного анион радикала $O_2^{\cdot-}$ с помощью люцигенин-зависимой хемилюминесценции (люц-ХЛ, рис. 1.9) и преимущественно гипохлорита $OSCl^-$ с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции (люм-ХЛ, рис. 1.10).

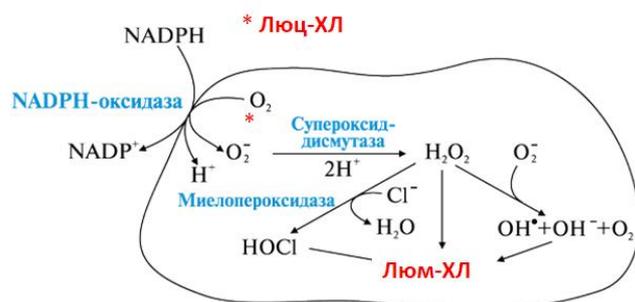


Рис. 1.8. Схема регистрации активации нейтрофилов методами люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции.

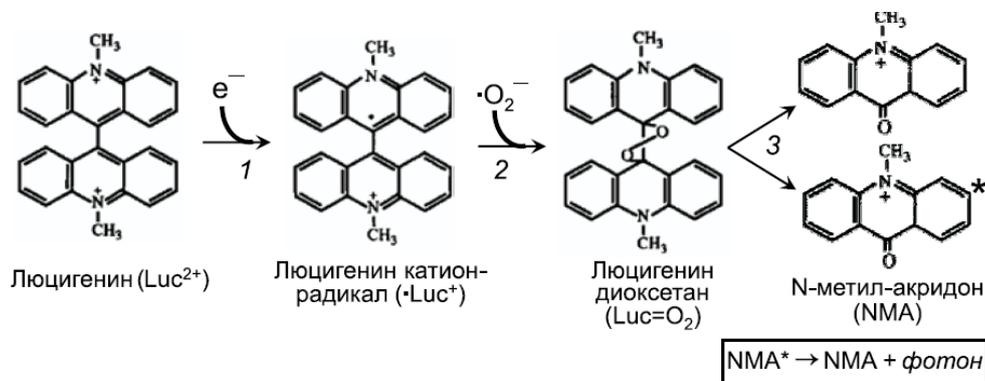


Рис. 1.9. Хемилюминесцентная реакция люцигенина [142].

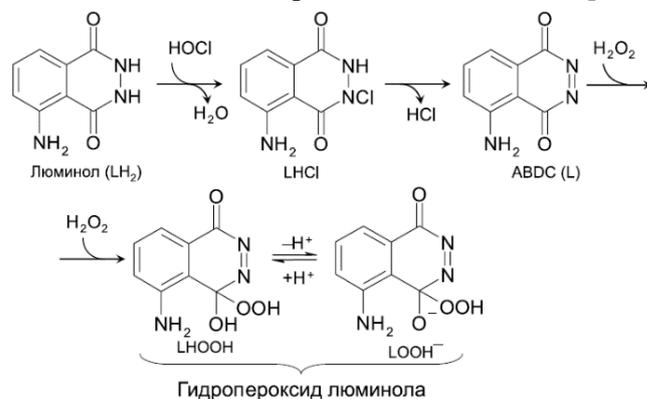


Рис. 1.10. Хемилюминесцентная реакция люминола [142].

В работе [139] с использованием люминол-зависимой хемилюминесценции сравнивали активацию нейтрофилов под действием трех полиморфных модификаций карбоната кальция (рис. 1.11). Арагонит и ватерит вызывали более сильную активацию нейтрофилов, по сравнению с кальцитом.

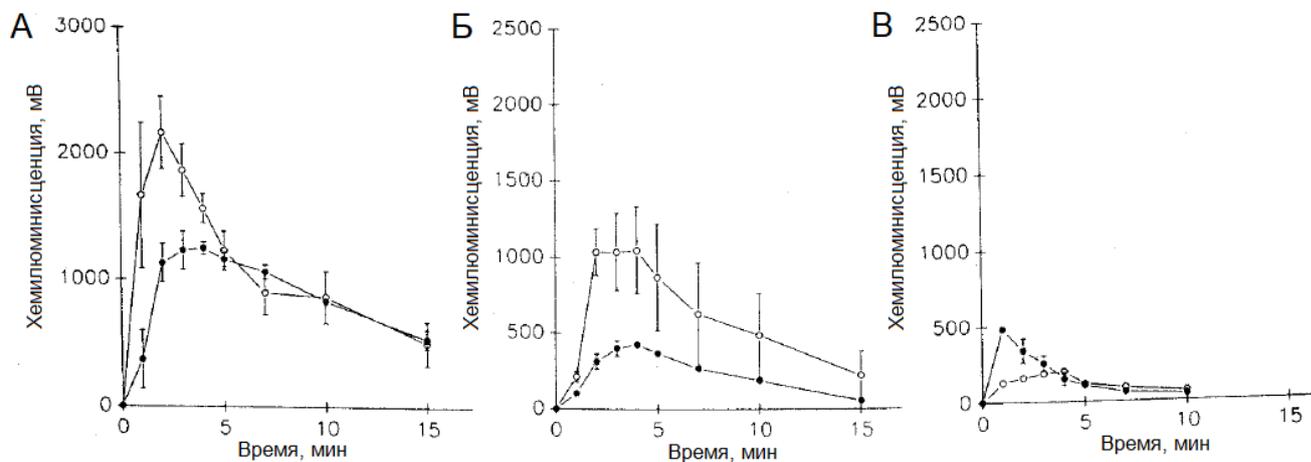


Рис. 1.11. Кинетика люминол-зависимого хемилюминесцентного ответа нейтрофилов ($5 \cdot 10^6/\text{мл}$) после воздействия кристаллов карбоната кальция до (незакрашенный символ) или после обработки плазмой крови (сплошной символ): (А) арагонит (10 мг/мл), (Б) ватерит (10 мг/мл) и (В) кальцит (10 мг/мл). Адаптировано из [139].

Для всех полиморфных форм величина хемилюминесцентного ответа возрастала с увеличением концентрации частиц. Более высокий хемилюминесцентный ответ нейтрофилов на воздействие арагонита и ватерита объясняли большей площадью поверхности их кристаллов (табл. 1.2). Несмотря на то, что площадь поверхности ватерита больше аналогичной величины для арагонита, последний вызывал более сильную активацию нейтрофилов, что связывали с морфологией полиморфной модификации [139].

После обработки всех полиморфных модификаций карбоната кальция плазмой крови человека наблюдалось снижение активации нейтрофилов под действием арагонита и ватерита (рис. 1.8 А, Б), тогда как для кальцита (рис. 1.8 В) происходило некоторое усиление активации. Однако даже в присутствии белков плазмы все три полиморфа оставались мощными активаторами нейтрофилов [139].

1.2.5. Заключение к разделу 1.2

Среди полиморфных форм карбоната кальция в качестве матрицы для послойной адсорбции полиэлектролитов особое внимание привлекает ватерит в виду самой высокой удельной площади поверхности, контролируемого размера частиц и мезопористой внутренней структуре. Благодаря биоразлагаемости, биосовместимости, низкой токсичности наноструктурированные

микросферы и наносферы ватерита являются привлекательными матрицами для послойной адсорбции полиэлектролитов при получении как частиц «ядро-оболочка», так и, после достаточно мягкого растворения карбоната кальция, мультислойных полимерных капсул.

Основными методами включения БАВ в сферы ватерита являются сорбция на частицах и соосаждение при их формировании. При соосаждении загрузка белка выше, чем при сорбции, однако в настоящее время отсутствует четкое понимание механизма включения и удерживания белков в сферах ватерита при двух методах включения.

Несмотря на многочисленные примеры капсулирования белков с использованием послойной адсорбции полиэлектролитов, недостаточно изучены вопросы сохранения активности иммобилизованных ферментов при предварительном включении в матрицы ватерита и при загрузке в уже готовые полимерные капсулы.

Для устранения низкой термодинамической стабильности ватерита и плохого включения положительно заряженных и низкомолекулярных БАВ при формировании полиморфной модификации добавляют различные биополимеры, что приводит к получению гибридных частиц с новыми физико-химическими свойствами и структурой. Поиск новых биополимеров, изменяющих морфологию и придающих новые свойства гибридным сферам ватерита, продолжается. Гибридные микросферы кажутся перспективными при использовании не только в виде матриц для послойной адсорбции полиэлектролитов, но и непосредственно для создания систем доставки лекарств, поэтому необходимо дополнительно изучать их биосовместимость и цитотоксичность, в том числе, исследуя взаимодействия с белками и элементами крови.

1.3. Роль, свойства и применение муцина. Мукозальная доставка белков

1.3.1. Биологическая роль муцина

Сильно гидратированный слизистый гель покрывает поверхность всех слизистых оболочек и защищает эпителиальные клетки от химического, ферментативного, микробного и механического воздействия. Слизь - комплекс вязкой клейкой секреции, синтезируемой в организме специальными бокаловидными клетками цилиндрического эпителия. Слизистая оболочка покрывает органы, подверженные воздействию внешней среды. Слизь выполняет много функций, среди которых сохранение влажной оболочки эпителия в виде геля, проницаемого для питательных веществ и газов, обволакивание объектов для прохождения по ЖКТ, защита на пути патогенных организмов и вредных веществ. Она является селективным барьером, обеспечивающим прохождение внутрь организма молекул размером не более 1 кДа и выделение наружу молекул значительно большего размера. Толщина слоя слизи варьируется от 10 мкм в глазу и трахее до 300 мкм в желудке и 700 мкм в кишечнике. Слой слизи не статичен, а перемещается для очистки от захваченного материала. Слизь действует как смазка, физический

барьер и ловушка для микробов и патогенов, она содержит в себе различные антимикробные вещества и ферменты [143-145].

Основным структурным и функциональным компонентом слизи являются муцины (1 - 5 %), ответственные за вязкие свойства слизистого геля, что подтверждается тем, что растворенный муцин с концентрацией близкой к концентрации в слизи проявляет сходные с ней свойства [144].

Муцины делятся на три отдельных подсемейства: секретируемые гелеобразующие муцины, муцины клеточной поверхности и секретируемые негелеобразующие муцины. Гелеобразующие муцины являются основным компонентом слизи и придают ей вязкоупругие свойства. Они содержат N- и C-концевые домены, богатые цистеином, которые участвуют в олигомеризации за счет образования дисульфидных связей. Секретируемые негелеобразующие муцины включают слюнный муцин, который может самоагрегировать, но не вносит значительного вклада в свойства слизи, и респираторный муцин. Муцины клеточной поверхности присутствуют на апикальной мембране всех эпителиальных клеток слизистой оболочки и содержат большие внеклеточные домены, которые образуют жесткие удлиненные структуры. Поверхностные муцины обеспечивают барьер, ограничивающий доступ других клеток и больших молекул к поверхности эпителиальных клеток [146].

Обычно слизистая оболочка покрыта постоянно пополняемым толстым слоем слизи (рис. 1.11 А), содержащим защитные вещества. Микробы могут жить во внешнем слое слизи, но благодаря толщине слоя контакт микробов с эпителиальными клетками маловероятен. Многие патогены способны разрушать слизистый слой на ранней стадии инфекции и проникать к поверхности эпителиальных клеток (рис. 1.12 Б). Изменение слизистой оболочки и доступность клеток эпителия для микробов приводят к возникновению патогенеза. После разрушения слоя слизи патогены достигают поверхности апикальной мембраны, которая заполнена плотным слоем поверхностных муцинов (рис. 1.12 В). Поверхностные муцины связываются с патогенами, отщепляя свои внеклеточные домены как молекулы-ловушки. В результате отделения внеклеточных доменов цитоплазматические домены муцинов передают сигнал о наличии микробов, генерируя ответ клеток на их присутствие. В ответ на инфекцию в муцинах происходят изменения, регулируемые эпителиальными клетками. Эти изменения включают гиперплазию бокаловидных клеток, повышенную секрецию муцина и изменение гликозилирования муцина (отображаемое на рис. 1.12 Г изменением цвета слоя слизи). Изменение этих факторов влияет на адгезию микробов и их способность разлагать слизь [145].

Изменения свойств муцина могут быть результатом воздействия микрофлоры и патологических нарушений процессов его синтеза.

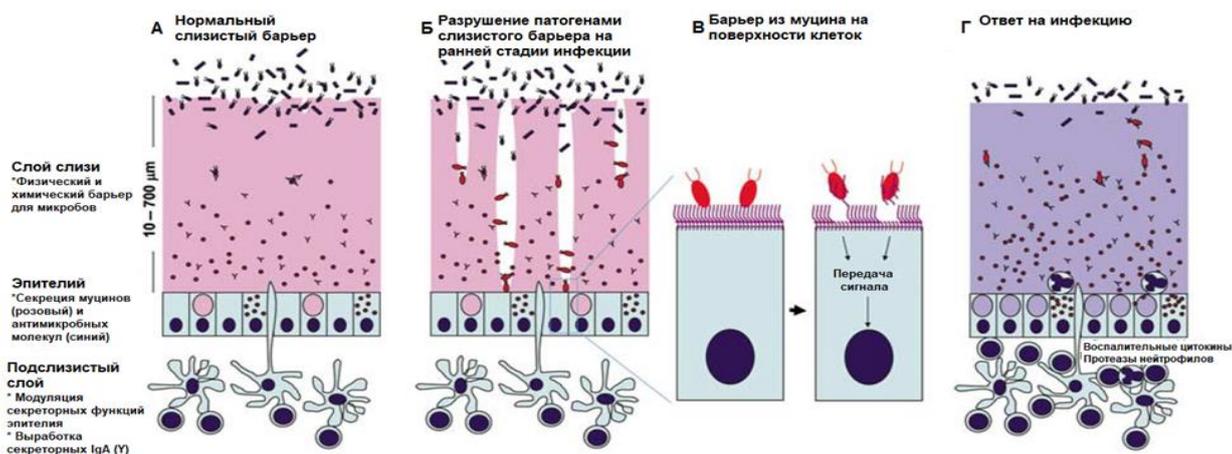


Рис. 1.12. Схематическое изображение строения слизистой оболочки. Адаптировано из [145].

1.3.2. Состав, строение и свойства муцина

Муцины - разновидность гликопротеинов, содержащих до 80 % углеводов, связанных О-гликозидными связями с белковым каркасом. Их характерной чертой является большая молекулярная масса (от 0,5 до 20 МДа) [147].

Специфический состав основных углеводов, представленный галактозой (Gal), N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), N-ацетил-галактозамин (GalNAc), фукозой (Fuc) и сиаловыми кислотами, и аминокислот, 50 % которых приходится на серин, треонин и пролин, отличает муцины от других подклассов гликопротеинов. Изоэлектрическая точка муцинов находится в интервале pH 3 - 4 [147]. Моносахариды в муцинах связываются в олигосахаридные цепочки, состоящие из 5 - 15 мономеров, которые прикрепляются к белковому стержню, образуя О-гликозидные связи с OH-группами серина и треонина [144].

Белковый стержень, составляющий порядка 20 % массы молекулы, разделяется на определенные участки (рис. 1.13):

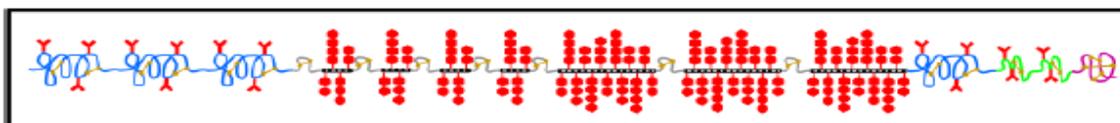
- 1) центральный гликозилированный участок, сформированный в основном серином, треонином и пролином и содержащий большое число tandemных повторов;
- 2) участки, богатые цистеином, расположенные на концах молекулы и между участками повторов серина, треонина, пролина. Благодаря остаткам цистеина образуются дисульфидные мостики как внутри, так и между молекулами мономеров [148].

Муцины склонны к агрегации и образуют гели. Гелеобразование происходит за счет образования дисульфидных связей и взаимопроникновения боковых углеводных цепей [149]. Агрегация и гелеобразование существенно зависят от источника выделения муцина, степени его очистки, pH и ионной силы среды, концентрации ионов Ca^{+2} [111, 143, 150, 151].

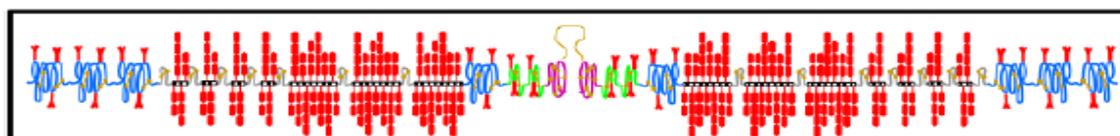
Домены муцинов



Мономер муцина



Димер муцина



Мультимер муцина

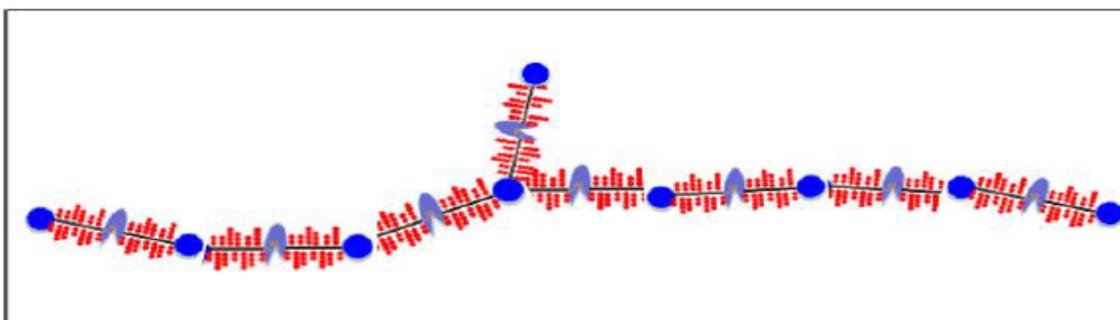


Рис. 1.13. Структура муцина, его димеров и мультимеров. Адаптировано из [143].

Муцины из слизи желудка способны к агрегации при pH 2, что защищает желудок от сильного воздействия кислоты, присутствующей в желудочном соке. Согласно данным динамического светорассеяния (ДЛС) при концентрации муцина больше 10 мг/мл процесс гелеобразования начинает происходить при $\text{pH} \leq 4$. При низких значениях pH наблюдается увеличение гидрофобности стержневого белка [152]. Атомно-силовая микроскопия подтвердила, что при значениях $\text{pH} \leq 4$ муцин образует агрегаты, а при pH 6 существует в виде отдельных молекул. Увеличение вязкости и гелеобразования не наблюдали, если муцин был разбит на субъединицы [153]. В процессе гелеобразования участвуют боковые цепи аминокислот из негликозилированных участков молекулы. При pH 6 - 7 негликозилированные богатые цистеином участки спрятаны в складках солевых мостиков между карбоксильными и аминогруппами. При более низком значении pH карбоксильные группы протонируются, что разрушает солевые мостики и способствует связыванию гидрофобных участков соседних молекул и образованию геля [150]. Запутывание боковых цепей сахаров дополнительно увеличивает вязкость растворов муцинов.

Установлена связь между изменением гликозилирования муцина, его олигомеризацией и колонизацией патогенных штаммов бактерий [154 -158]. Выявлены группы бактерий, способные ферментативно разрушать компоненты муцина. *Fusobacterium sp.* содержат гены ферментов, участвующих в метаболизме сиаловых кислот и способствующих отщеплению сиаловых кислот, что приводит к разрушению муцина [159-162]. Изменения в гликозилировании муцина наблюдаются при патологических процессах: раке молочной железы и толстой кишки, колите и других воспалительных заболеваниях кишечника [161-166]. При этом меняются степень сульфатирования, сиалирования и длина олигосахаридных цепочек [167-169].

Концентрация ионов Ca^{2+} оказывает существенное влияние на макромолекулярную организацию муцина [169-173], что важно для процессов биоминерализации в организме, например, при образовании камней, в том числе в желчном пузыре [170, 174]. В процессе синтеза и секреции гликопротеина компенсация одноименных зарядов муцина ионами Ca^{2+} позволяет в 100 - 200 раз увеличить плотность его упаковки в секреторных гранулах [143]. При воздействии внеклеточной среды с более низкими концентрациями H^+ и Ca^{2+} диффузия ионов приводит к электростатическому отталкиванию фрагментов молекулы муцина, в результате чего молекула претерпевает быстрый фазовый переход, сопровождающийся ее расширением. Развернувшаяся в объеме молекула муцина покрывает внешнюю апикальную поверхность клетки, защищая ее от внешних воздействий [143].

1.3.3. Биомедицинское применение муцина

Области использования муцинов постоянно расширяются [175]. Наиболее часто гликопротеин применяют в модельных системах для изучения проникновения различных частиц через слизистые оболочки. Связывание (адгезия) муцина на поверхности носителей анализируют для прогноза мукоадгезивных свойств при доставке БАВ. Обычно исследования проводят с помощью коммерческого муцина из желудка свиньи с молекулярной массой около 600 кДа, в ряде случаев - после его очистки с помощью анионообменной и эксклюзионной хроматографии для удаления крупных агрегатов и нежелательных примесей или со свежесекретированным гликопротеином [176].

Муцины активно применяли в качестве основного компонента растворов со смазывающим действием и пленок, в том числе против биообрастания [177-181]. Отдельные функции мембраносвязанных муцинов могут быть воссозданы *in vitro* путем получения поверхностно-прикрепленных секреторируемых муцинов.

Наличие различных функциональных групп, таких как цистеины, амины и сиаловые кислоты, делают муцины перспективными объектами для различных химических модификаций, которые позволяют прикреплять муцины к разнообразным поверхностям, а также получать сложные гидрогели и микро- и наночастицы на их основе [175]. Биосовместимость и

биodeградируемость муцинов позволяет создавать носители перспективные для доставки и контролируемого высвобождения различных БАВ [175, 182]. Муцины были использованы в качестве структурного компонента микроконтейнеров для БАВ, входили в состав закрепленных на поверхностях монослойных пленок или многослойных пленок в паре с другими биополимерами (рис. 1.14 А). Кроме этого, муцины слизи сами инициировали выделение БАВ из носителей и распад биопленок (рис. 1.14 Б), входили в состав вакцин (рис. 1.14 Б).

Муцин адсорбировали на кремнеземе и гидрофобизированном кремнеземе [183]. С использованием метода эллипсометрии установлено, что гликопротеин лучше связывался с гидрофобизированной поверхностью диоксида кремния (соответственно 1,2 и 3,8 мг/м²). Описаны адсорбция (2,2 мг/м²) и прочное удерживание муцина на наночастицах полистирола диаметром 280 нм [184]. Толщина муцинового покрытия составляла 4 - 6 нм, а частицы приобретали гидрофильные свойства.

Наличие сиаловых кислот (рК_а 2,6) на концах углеводных цепочек обеспечивает отрицательный заряд муцина в нейтральных и щелочных средах [150]. Муцины из различных источников использовали в качестве полианионов при образовании полиэлектролитных комплексов и полиэлектролитных слоев. В качестве поликатиона при этом применяли полиаллиламин, полиэтиленимин, полилизин, хитозан, лактопероксидазу [183, 185-189]. Толщина образующихся пленок зависела от рН и ионной силы растворов.

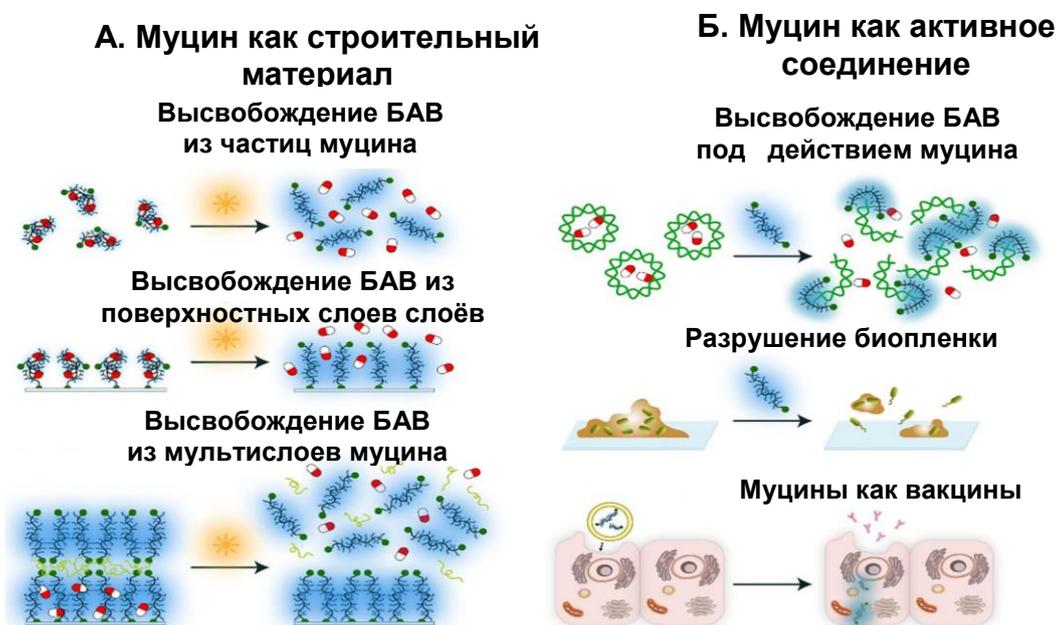


Рис. 1.14. Использование муцина в качестве компонента контейнера или пленки для доставки БАВ (А) и как активного соединения, вызывающего высвобождение БАВ (Б) [175].

Известно получение гибридных материалов муцина с полиэтиленгликолем (ПЭГ) [190-192], альгинатом [193], целлюлозой [194], метилцеллюлозой [189] и хитозаном [195].

Отрицательный заряд муцина придавал дополнительные свойства матрице, а обогащенные муцином гидрогели лучше включали положительно заряженные БАВ и замедляли их высвобождение [189, 196].

На основе муцина получали стимул чувствительные контейнеры, претерпевающие в конформационные изменения под действием внешних факторов [197, 198]. Добавление глицерина вызывало резкое сжатие молекул муцина, что приводило к уменьшению их размера на порядок до десятков нанометров. Эффект сжатия был обратимым и дополнительно усиливался при добавлении катионов Ca^{+2} или полилизина. Предполагалось, что муцин, связывая в конденсированной форме различные вещества, будет их высвобождать при расширении [197]. В другом варианте муцин дегликозилировали и сжимали с использованием поверхностно-активных веществ и нагревания. При изменении условий частицы муцина открывались, выпуская включенный лизоцим, дополнительно расщепляющий гликопротеин [198]. Аналогично поверхностно связанные слои муцина надежно удерживали БАВ, пока их состояние поддерживалось двухвалентными катионами. При воздействии физиологических концентраций NaCl наблюдалась расширение слоя гликопротеина с выделением БАВ [196].

Стимул чувствительные мультислой муцина с лектинами, стабильные в широком диапазоне pH и ионной силы, разрушались при добавлении углеводов, имеющих большее сродство к лектинам [196, 199, 200].

При конъюгировании муцина с синтетической ДНК были получены наночастицы, которые после усвоения клетками открывались только под действием микроРНК, экспрессируемой в клетках-мишенях, содержащих правильный триггер молекул микроРНК [201].

1.3.4. Мукозальная доставка

1.3.4.1. Особенности мукозальной доставки белков

Доставка через слизистые (мукозальная доставка) объединяет буккальный, пероральный, ректальный, назальный, вагинальный и окулярный пути, каждый из которых имеет особенности [202]. Мукозальные системы доставки должны обладать мукоадгезивными свойствами, т.е. способностью связаться со слизистой оболочкой, удержаться на ее поверхности в течение длительного времени, высвободив БАВ вблизи места абсорбции, и далее удалиться с минимальным повреждением слизистой оболочки.

Окулярная доставка лекарственных веществ через слизистую глаза, несмотря на простоту, может быть осложнена слезотечением и раздражением роговицы, однако скорость абсорбции БАВ в кровотоки сравнима с инъекционным введением [203].

При доставке через ротовую полость значительную роль играют ее физиологические аспекты, такие как pH, объем жидкости, ферментативная активность, проницаемость слизистой [204]. В отличие от изменяющихся сред ЖКТ, среда ротовой полости относительно стабильна, что

обеспечивается постоянной секрецией слюны. Слюна подвижна, содержит меньше муцина, и имеет низкую протеолитическую активность [205]. Слюна обеспечивает влагой среду ротовой полости, однако ее ток ограничивает время пребывания высвободившегося лекарства в месте абсорбции и приводит к преждевременному проглатыванию лекарства до того, как произойдет абсорбция на слизистой. Поверхность ротовой полости выстлана многослойным эпителием. Участки, подвергающиеся механическим воздействиям, связанным с жеванием (десны и твердое небо), покрыты кератинизированным эпителием, схожим с эпидермисом кожи. Такой эпителий содержит нейтральные липиды, такие как церамиды и ацилцерамиды, которые носят барьерную функцию, и слабопроницаем даже для воды. Дно полости рта и щеки, которые должны быть мягкими при пережевывании пищи и речи, покрыты некератинизированным эпителием, сходным с пищеводом [204]. Некератинизированный эпителий значительно более проницаем, чем кератинизированный [206].

Основным преимуществом носовой полости для доставки белков является высокая насыщенность сосудами. Трудности назальной доставки связаны с коротким временем пребывания веществ в носовой полости вследствие движения слизи мерцательным эпителием, с физическим удалением препаратов за 15 - 30 мин [207], низкой проницаемостью эпителия и ферментативной деградацией [208]. В связи с этим эффективная абсорбция не происходит без применения вспомогательных агентов, усиливающих абсорбцию и увеличивающих проницаемость эпителия, продлевающих пребывание препаратов в носовой полости, а также защищающих белок от действия протеаз. Назальная доставка неприменима при заложенности носа, рините и насморке.

При пероральной доставке самой привлекательной областью является тонкий кишечник (табл. 1.4).

Таблица 1.4. Сравнение слизистых оболочек отделов ЖКТ [209]

Отдел	Доля общей поверхности, %	pH	Средний объем слизи, мл	Относительная активность ферментов	Относительная способность к абсорбции
Ротовая полость	0,01	5,8 - 7,6	0,9	средняя	средняя
Желудок	0,20	1,0 - 3,0	118	высокая	средняя
Тонкий кишечник	98,76	5,0 - 7,0	212	высокая	высокая
Толстый кишечник	0,99	6,0 - 7,4	187	средняя	низкая
Прямая кишка	0,04	7,0 - 7,4	-	низкая	низкая

Площадь его поверхности почти на 2 порядка больше, чем у остальных отделов ЖКТ вместе взятых, всасывание веществ в данном отделе происходит наиболее легко, а pH среды нейтральное. Тонкий кишечник взрослого человека обладает поверхностью 250 м² [210], что определяется его

основной функцией – переваривать и всасывать питательные вещества, воду и витамины из пищи, при этом служить барьером для патогенов, токсинов и непереваренных макромолекул.

Пероральный путь доставки сопряжен с очень низкой биодоступностью для белков, что связано со следующими основными причинами [211]: 1) денатурацией и гидролизом белка при низких значениях pH желудочного сока; 2) расщеплением белка под действием протеолитических ферментов желудка и тонкого кишечника; 3) низкой проницаемостью слизистого эпителия для больших гидрофильных молекул.

Для улучшения мукозальной доставки, и, в первую очередь, пероральной доставки белков, применяются специальные подходы, включающие использование мукоадгезивных полимеров, защиту белков от протеолиза и усиление абсорбции клетками кишечника, что должно способствовать защите и контролируемому высвобождению белка в нейтральных средах, а при необходимости его доставке в кровотоки.

1.3.4.2. Увеличение биодоступности белков при мукозальной доставке

1.3.4.2.1. Использование мукоадгезивных полимеров

Мукоадгезивные полимеры по поверхностному заряду делятся на три основные группы: анионные, катионные и неионные (табл. 1.5).

Таблица 1.5. Основные многофункциональные мукоадгезивные полимеры и их свойства [202]

Полимеры (группа полимеров)	Свойства
Полианионы (полиакрилаты, альгинаты, карбоксиметилцеллюлоза)	мукоадгезивность, усилитель проницаемости, ингибирование ферментов, контролируемое высвобождение
Поликатионы (хитозан)	мукоадгезивность, усилитель проницаемости, контролируемое высвобождение, биосовместимость
Неионные полимеры (тиомеры)	мукоадгезивность, усилитель проницаемости, ингибирование ферментов, контролируемое высвобождение

Заряженные полимеры проявляют более выраженные мукоадгезивные свойства [212]. Анионные полимеры наиболее часто применяют для приготовления лекарственных форм, что связано с их высокой мукоадгезивностью и низкой токсичностью. Такие полимеры характеризуются наличием карбоксильных и сульфатных групп, повышающих общий отрицательный заряд системы доставки при pH, превышающих рK_a полимера. Типичными представителями являются полиакриловая кислота, альгинат и карбоксиметилцеллюлоза, мукоадгезивность которых в основном обусловлена сильным взаимодействием с муцином за счет водородных связей [213].

Среди катионных мукоадгезивных полимеров наибольшее распространение получил хитозан [214]. Мукоадгезивность хитозана определяется в первую очередь ионными взаимодействиями аминогрупп с отрицательно заряженными остатками сиаловых кислот муцина. Биополимер способен задерживаться на слизистой более, чем на сутки [215].

Тиолированные полимеры (тиомеры) разрабатывались с целью повышения мукоадгезивности за счет образования дисульфидных связей с богатыми цистеинами доменами муцина [202].

Среди других мукоадгезивных полимеров следует отметить гиалуроновые кислоты [216], использовавшиеся для окулярной доставки из-за родства к гликопротеинам слизистой глаза, и пектин [217].

Мукоадгезия обеспечивается ионными, ковалентными и водородными связями, а также силами Ван-дер-Ваальса и гидрофобными взаимодействиями [202]. Начальная стадия плотного контакта полимера со слизистой приводит к консолидации, в которой физико-химические взаимодействия ведут к продолжительной адгезии. Помимо характеристик полимеров и слизистой на взаимодействия влияют рН среды и наличие ионов металлов [218]. Различные характеристики слизистых позволяют доставлять лекарство в определенные отделы кишечника. Анионные полимеры способны лучше связываться со слизистой в кислой среде желудка за счет водородных связей, тогда как катионные полимеры слабо взаимодействуют с малозаряженным муцином в этой среде. Хитозан мукоадгезивен при физиологических значениях рН [214]. Покрытие хитозаном продлевало пребывание в тонком кишечнике частиц размером 10 - 20 и даже 75 мкм [219]. Пектин показал наилучшие адгезивные свойства к слизистой толстого кишечника, что позволяет использовать его для направленной доставки лекарств в эту область [217].

1.3.4.2.2. Защита от протеолиза

Белки и пептиды при мукозальной доставке могут абсорбироваться через слизистые оболочки и проходить в кровоток в нативном виде при условии, что они защищены от ферментативного гидролиза [220]. Однако перорально доставляемые белковые вещества могут встретить более 40 различных пептидаз при прохождении ЖКТ человека [221].

Среда желудка характеризуется низким рН (экстремально низким натощак, до значения 1,1) и заметной протеолитической активностью, обусловленной наличием пепсинов. Пепсины обладают достаточно широкой специфичностью, предпочтительно гидролизуют связи Phe-, Met-, Leu-, Trp- и других гидрофобных остатков. Для защиты от протеаз желудка обычно используют полиэлектролитные системы, позволяющие обеспечить высвобождение белка в нужном отделе кишечника. Другим, более редким подходом, является использование ингибиторов пепсина [222].

Наибольшая концентрация протеолитических ферментов наблюдается в тонком кишечнике: в двенадцатиперстной кишке, в дальней части тощей и меньше в подвздошной кишке [223]. В просвет двенадцатиперстной кишки выделяются секретируемые в поджелудочной железе сериновые эндопептидазы с остатком серина в активном центре и карбоксипептидазы с цинком в активном центре (табл. 1.6).

Эндопептидазы, представленные трипсином, химотрипсином и эластазой, структурно связанная группа с гомологией в аминокислотной последовательности около 50 %. Две группы карбоксипептидаз А и В в свою очередь гомологичны между собой. Соотношение трипсина к химотрипсину и к эластазе в соке поджелудочной железой оценивается примерно 20:1:2 [221]. За сутки секретируется суммарно около 45 г перечисленных ферментов. Карбоксипептидазы обладают наиболее широкой специфичностью, способны отщепить ряд алифатических аминокислот (табл. 1.6) [221]. Действие карбоксипептидаз происходит в тандеме с сериновыми пептидазами. Продукты гидролиза трипсином, содержащие лизин и пролин, являются объектами гидролиза для карбоксипептидазы В, а продукты гидролиза химотрипсином и эластазой расщепляются карбоксипептидазой А.

Таблица 1.6. Специфичность панкреатических пептидаз [221]

Фермент	Гидролизуемая связь
Трипсин	—○—○—●—↓—○— Arg, Lys
Химотрипсин	—○—○—●—↓—○— Phe, Tyr (некоторые другие гидрофобные)
Эластаза	—○—○—●—↓—○— Ala, Gly, Leu, Val, Ileu
Карбоксипептидаза А	—○—○—○—↓—● Tyr, Phe, Ileu, также: Thr, Glu, His, Ala
Карбоксипептидаза В	—○—○—○—↓—● Arg, Lys, гидроксизин, орнитин

В тонком кишечнике выделяют две стадии гидролиза пищевых белков: гидролиз протеазами просвета кишечника и мембран-связанными протеазами щеточной каемки, а также протеазами цитозоля клеток эпителия, играющими важную роль при трансцеллюлярном транспорте белков. Для предотвращения протеолиза целевых белков в тонком кишечнике изучали возможность их выделения в толстом кишечнике, где концентрация протеолитических ферментов сравнительно низка [224]. Для такой доставки обычно используют полимерное покрытие, выдерживающее среды желудка и тонкого кишечника и разрушающееся микроорганизмами толстого кишечника [225]. Обитающие в толстом кишечнике более 400 родов микроорганизмов производят широкий спектр протеаз различных групп [221]. Активность протеаз толстого кишечника оценивается в 25 % от общей активности в тонком кишечнике.

Для преодоления белками энзиматического барьера использовали включение в липосомы [226] и в различные нано- и микрочастицы [227]. Как правило, такие носители защищают от ферментативного расщепления путем создания пространственных затруднений доступа протеаз к белку или непосредственно ингибируя ферменты. Наиболее простой из стратегий преодоления протеолиза белков является доставка совместно с полимерами, способными уменьшить активность протеаз. Для этого применяли полиаллиламин [228], полиакриловую кислоту в виде сополимера с крахмалом [229], гидрогель полиакриловая кислота - ПЭГ- хитозан [230] и др. Использовали способность некоторых полимеров связывать Ca^{2+} , тем самым снижая активность Ca^{2+} -зависимых сериновых протеаз [229, 230]. Предложены подходы с покрытием матриц, содержащих целевой белок, альбумином [231, 232], расщепление которого ферментами защищало целевые белки.

К мультифункциональным полимерам, способным ингибировать протеолитические ферменты, относятся полиакрилаты, тиолированные полимеры, образующие комплексы с двухвалентными катионами [233]. Двухвалентные катионы, в частности, Zn^{2+} и Ca^{2+} , являются важными кофакторами для большинства протеолитических ферментов, а их удаление из среды приводит к снижению активности протеаз. Однако общая проблема применения комплексообразующих полимеров состоит в высокой концентрации указанных ионов, в том числе и при пероральной доставке. Для уменьшения активности протеаз использовали также хитозан-ЭДТА [234-236], карбопол [237], полиакриловую кислоту в виде сополимера с крахмалом [229], гидрогель полиакриловая кислота - ПЭГ-хитозан [230].

Для более надежной защиты от воздействия протеолитических ферментов тонкого кишечника предложена одновременная доставка целевых белков с небелковыми и белковыми ингибиторами протеаз [238-240]. Эффективность использования ингибиторов протеаз была неоднократно показана, но постоянно поднимаются вопросы потенциальной токсичности [240], так как полагают, что защитить белки могут только высокие дозы ингибиторов, способные вызвать нарушение переваривания, а в некоторых случаях гипертрофии или гиперплазии поджелудочной железы вследствие нарушения регуляции выработки секрета [241]. В связи с этим стараются ограничить область действия ингибиторов местом всасывания лекарства, а также использовать системы, обеспечивающие схожие профили высвобождения ингибитора и целевого белка, что позволит минимизировать количество доставляемого ингибитора и, соответственно, уменьшить вызываемые им побочные эффекты [242]. Небелковые ингибиторы протеаз (соли желчных кислот, химостатин, эластинал и бацитрацин) имеют более высокую токсичность, чем белковые [240]. Белковые ингибиторы представлены апротинином из легких быка (Апр) [243, 244], овомукоидом из утиных яиц [245], двумя ингибиторами из сои типа Баумана-Бирк (ИББ) [246] и типа Кунитца (ИТК) [247, 248, 249]. Апротинин, состоящий из 58 аминокислот, является основным белком и

ингибирует широкий круг ферментов, включая трипсин, химо трипсин, калликреин, плазмин. Совместная доставка с аprotинином приводила к повышению биодоступности белков. Данный эффект определялся ингибированием основных протеолитических ферментов тонкого кишечника - трипсина и химо трипсина [239, 250]. Соевые ингибиторы ИББ [246] и ИТК [247] способны в различной степени ингибировать трипсин, химо трипсин и эластазу, но неспособны ингибировать карбоксипептидазы А и В. Белковые ингибиторы сочетают низкую токсичность с высокой ингибирующей способностью, что делает их наиболее интересными вспомогательными агентами для преодоления энзиматического барьера при пероральной доставке терапевтических белков и пептидов.

Благодаря высокой молекулярной массе белковых ингибиторов протеаз возможно добиться их контролируемого высвобождения из систем доставки. Была показана эффективность медленного высвобождения аprotинина из сфер поливинилового спирта для повышения биодоступности инсулина [251]. Белковые частицы из крахмала с аprotинином предложены для мукозальной доставки ряда белков и пептидов [250]. Для защиты инсулина при пероральном введении применяли овомукоид, ковалентно сшитый с матрицей полиакриламидного геля [252], конъюгаты ИББ с полиакриловой кислотой [242], хитозаном [253] и карбоксиметилцеллюлозой [254].

При использовании микросфер из полиакриловой кислоты, содержащих инсулин и белковые ингибиторы протеаз, было показано понижение уровня глюкозы в крови крыс с диабетом, убывающее в ряду: аprotинин > ингибитор Баумана-Бирк > химостатин = ингибитор Кунитца [255].

1.3.4.2.3. Усиление проникновения через эпителий кишечника

Транспорт веществ и частиц через эпителий может осуществляется лимфатическим захватом М-клетками Пейеровых бляшек, трансцеллюлярным и парацеллюлярным путями (рис. 1.14) [256].

М-клетки Пейеровых бляшек являются высоко специализированными и отличаются от энтероцитов отсутствием щеточной каемки эпителия и более тонким слоем слизи на поверхности (рис. 1.15). М-клетки эндоцитозом транспортируют макромолекулы и частицы из просвета кишечника к базолатеральной полости, куда высвобождаются экзоцитозом [210]. В полости макрофаги и лимфоциты взаимодействуют с доставленными агентами, включая таким образом слизистый иммунный ответ.

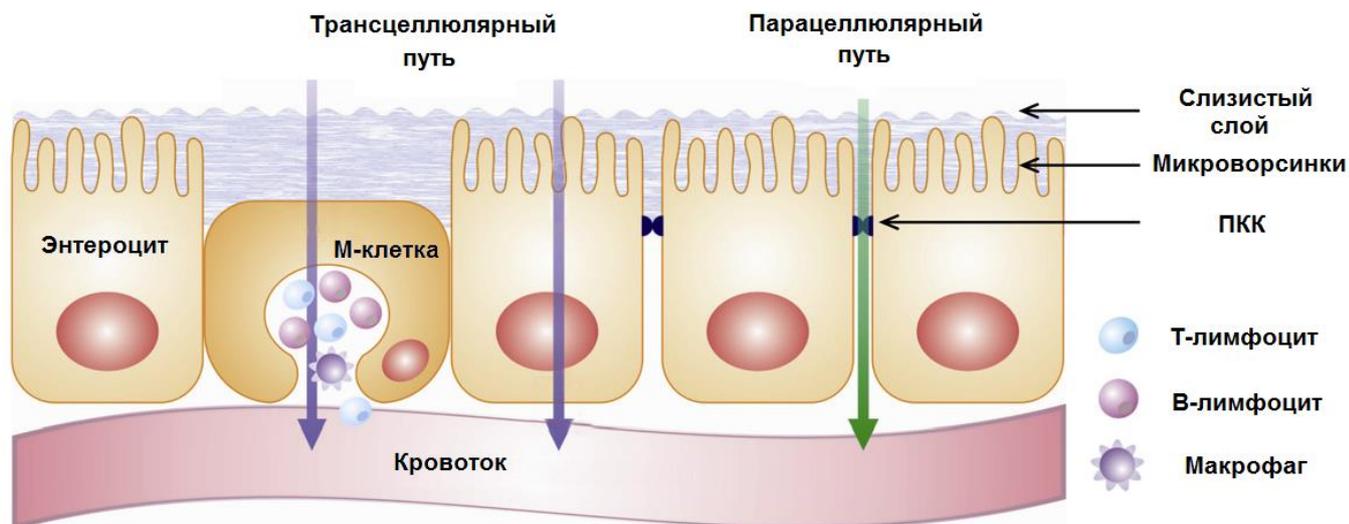


Рис. 1.15. Схема механизмов захвата БАВ эпителием кишечника. Адаптировано [256].

Лимфатический захват М-клетками является самым распространенным путем транспорта частиц через эпителий. Так могут быть захвачены частицы до микроразмеров [257], но известно и проникновение частиц размером до 15 мкм [258]. Эффективность захвата увеличивается с уменьшением размера частиц. Недостатком пути является транспорт частиц целиком, а не отдельно доставляемого лекарства, что способно привести к системным токсическим эффектам. Описан эффективный захват частиц, покрытых альбумином и ПЭГ [259], микрочастиц из хитозана [260].

При трансцеллюлярном пути абсорбция пептидов (более 3 - 4 аминокислотных остатков) и белков эпителиальными клетками происходит путем эндоцитоза (рис. 1.15). Вещества попадают в лизосомы, содержащие более 60 протеолитических ферментов [221]. Таким путем могут захватываться и наночастицы, причем проникновение частиц размером 100 нм происходило в 15 - 250 раз активнее, чем частиц размером 500 нм и больше [261]. Ингибитор протеаз Баумана - Бирк из сои захватывался клетками эпителия кишечника, что позволяло ему ингибировать внутриклеточные протеазы [262]. Белок наблюдали в цитозоле клеток в течение 12 ч после контакта со средой, содержащей ингибитор. Поскольку данный эффект наблюдался и для других белков, было сделан вывод о неспецифическом способе захвата.

Плотные контакты клеток эпителия (epithelial tight junctions, ПКК) являются полупроницаемым барьером для парацеллюлярного транспорта ионов и веществ (рис. 1.15), преградой на пути от апикальной к базолатеральной стороне эпителия [263]. ПКК имеют вид ряда параллельных протяженных тяжей по периметру клетки. На молекулярном уровне они состоят из ряда мембранных белков (окклюдин, клаудины, молекулы адгезии контактов),

цитоплазматических белков (белки запирающей зоны ZO-1, ZO-2, ZO-3) и ассоциированных с ними белков. Парацеллюлярный транспорт перорально доставляемых лекарств возможен только после раскрытия ПКК, поддерживающих целостность эпителия. Наиболее часто этот процесс происходит на кончиках ворсинок поверхности кишечника, где постоянно происходит обновление клеток. Во время обновления эпителия межклеточные расстояния могут увеличиваться, что позволяет захватить частицы размером до 150 нм [258]. Специальные агенты (ПАВ, хитозан и др.) способны обратимо раскрывать ПКК, повышая проницаемость эпителия. Это происходит путем активации протеинкиназы С и транслокации белка ZO-1 и окклюдина в мембране [264]. Раскрытые с помощью усилителей абсорбции ПКК имеют ширину до 20 нм [265] или даже до 155 нм [266], что достаточно для транспорта крупных белковых молекул, но недостаточно для крупных частиц.

Удаление ионов Ca^{2+} из среды повышает парацеллюлярную проницаемость монослоя клеток эпителия и снижает электрическое сопротивление через раскрытие ПКК за счет Ca -зависимого контакта клаудинов [267]. Снижение концентрации Ca^{2+} в среде на 200 мкМ вызывает повышение электрической проницаемости эпителия более чем на порядок с дальнейшим выходом на плато [268]. Данного эффекта достигали при использовании хелатирующих агентов, полиэлектролитов с кислотными группами и хитозана, способного взаимодействовать с катионами благодаря свободной электронной паре основного атома азота аминогруппы [269]. Покрытые хитозаном наночастицы связывали больше кальция, чем свободный полимер [270]. В целом усиление проницаемости эпителия происходит за счет взаимодействия хитозана с апикальной стороной клеток и раскрытия ПКК [271], при чем данный эффект является временным и обратимым. Интенсивность раскрытия ПКК зависит от интенсивности заряда полимера, однако при повышении заряда выше определенного уровня наступало насыщение.

1.3.5. Заключение к разделу 1.3.

Высокомолекулярный гликопротеин муцин является основным компонентом всех слизистых и, благодаря своему строению, обладает специфическими физико-химическими свойствами, зависящими от условий окружающей среды, в том числе существенно от pH и концентрации ионов Ca^{2+} .

Области возможного использования муцинов постоянно расширяются. Муцин применяют при анализе мукоадгезивных свойств биополимеров и новых носителей, при изучении проникновения частиц различного размера и состава через слизистые слои, а также в составе смазочных растворов и пленок. Наличие различных функциональных групп (цистеины, амины, сиаловые кислоты) делает муцины перспективными объектами для различных химических модификаций, которые позволяют получать сложные гели, прикреплять гликопротеин к

различным поверхностям, использовать в послойной адсорбции, а также создавать стимул-чувствительные контейнеры для доставки БАВ.

Мукозальный путь доставки белков и пептидов через слизистые поверхности привлекает особое внимание. В настоящее время активно ведется поиск новых носителей для перорального, буккального, назального, пульмонарного, ректального, вагинального и окулярного способов введения препаратов.

Основными стратегиями повышения биодоступности белков и пептидов при мукозальной доставке являются: использование мукоадгезивных биополимеров, обеспечивающих целевую доставку, удерживание на слизистой поверхности и пролонгированное высвобождение белков; защита белков от гидролиза и протеолиза, в том числе с использованием ингибиторов протеаз; повышение проницаемости эпителия для проникновения белков.

Создание многофункциональных средств мукозальной доставки белков с использованием послойной адсорбции мукоадгезивных биополимеров, в том числе хитозана и муцина, является востребованным и актуальным.

1.4. Использование белоксодержащих мультислойных частиц

1.4.1. Перспективы использования полиэлектролитных частиц

Технологию послойной адсорбции полиэлектролитов с применением белков использовали в клеточной [272, 273] и тканевой инженерии, регенеративной медицине [274], при изготовлении биосенсоров (обнаружение холестерина [275], глюкозы [276]), при получении противообрастающих покрытий и противомикробных материалов [277], вакцин [278] и особенно активно для создания систем доставки лекарств [279].

Общие проблемы, упомянутые при получении продуктов с использованием техники послойной адсорбции полиэлектролитов, состояли в трудностях масштабирования и автоматизации процессов, в сложностях стадий стерилизации и высушивания готовых материалов, в низкой стабильности готовых препаратов при хранении. Активно обсуждалось отсутствие нормативно-технических документов, регулирующих производство и применение продуктов, особенно наноразмера [62, 279].

В зависимости от выбранных полимеров затраты на получение полиэлектролитных частиц могут существенно варьироваться. С использованием широко распространенных синтетических полиэлектролитов ПСС и ПАА изготавливали капсулы с ориентировочной стоимостью 40 €/г, а применение дорогих биоматериалов увеличивало стоимость в сотни раз. Такие затраты были уже сопоставимы с новыми коммерческими терапевтическими препаратами: вакциной от Covid-19 на основе липидов BioNTech/Pfizer (4000 €/г) или липосомным противораковым препаратом Доксил (20000 €/г) [62].

Широкий выбор матриц и полимеров различной природы, варьирование архитектуры частиц и количества полиэлектролитных слоев, достаточно высокая эффективности загрузки широкого круга белковых препаратов позволяют получать стимул-чувствительные полиэлектролитные частицы, перспективные для доставки БАВ в определенные органы, ткани и биологические среды. Использование мукоадгезивных полимеров при формировании полиэлектролитных слоев должно способствовать повышению биодоступности при мукозальной, в том числе, пероральной доставке белков. Получение полиэлектролитных частиц наноразмера позволило активно исследовать возможности внутривенного введения препаратов. Одновременное использование нескольких подходов при послойной адсорбции полиэлектролитов для включения белковых и лекарственных препаратов позволяет создавать комбинированные и многофункциональные частицы. Включение в полиэлектролитные частицы отдельных биополимеров, антител или их конъюгатов может способствовать высвобождению целевых продуктов в ответ на изменение внешних условий или вблизи ткани, служащей мишенью воздействия [81, 280].

1.4.2. Стимул-чувствительное высвобождение белков

На высвобождение БАВ из полиэлектролитных частиц различного строения и состава могут оказывать влияние химические (рН, ионная сила, электрохимическое воздействие), биологические (вещества, ферменты, рецепторы и т.д.) и физические факторы [4, 81, 280].

Присутствие в микро- и наночастицах биополимеров, в частности белков, накладывает ограничения на условия функционирования полиэлектролитных частиц, что делает актуальным исследование их поведения при физиологических значениях рН и ионной силы растворов. В большинстве случаев средством контроля состояния полиэлектролитных частиц служит кислотность среды, приводящая к изменению локального рН внутри микрочастиц. Если хотя бы один из используемых полиэлектролитов представляет собой слабое полимерное основание, слабую поликислоту или полиамфолит (например, белок), варьированием рН раствора можно менять плотность заряда и конформацию заряженных цепей, входящих в состав полиэлектролитных мультислоев. Присутствие в оболочках белков, имеющих относительно невысокие величины рI, может вызывать существенные рН-зависимые колебания суммарного заряда частиц и изменения проницаемости полиэлектролитных стенок по отношению к белкам и другим БАВ.

рН-чувствительные свойства биополиэлектролитных частиц различного состава и строения были многократно исследованы (табл. 1.7).

Таблица 1.7. Примеры стимул-чувствительных белок содержащих частиц, полученных послойной адсорбцией полиэлектролитов

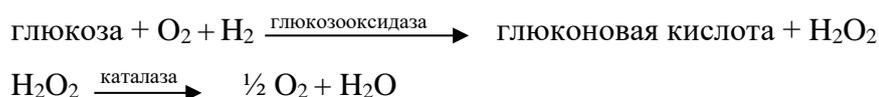
Стимул	Строение микрочастиц	Характеристика полиэлектролитов	Белок (метод включения)	Ссылка
1	2	3	4	5
рН	полые микрокапсулы на матрице ватерита	декстрансульфат 500 кДа/ хитозан 650 кДа	основной фактор роста фибробластов (включение в капсулы)	[87]
	матриксные микрокапсулы на матрице меламинформальдегида	альгинат средней вязкости / протамин	химотрипсин (включение в капсулы)	[70]
	матриксные микрокапсулы на матрице ватерита	декстрансульфат 10 кДа/ полиаргинин 70 кДа	пероксидаза, овальбумин (соосаждение)	[281, 282]
	матриксные микрокапсулы на матрице ватерита	полилизин 15 - 30 кДа/ хондроитинсульфат	БСА (адсорбция на матрице)	[86]
	матриксные микрокапсулы на матрице гидроксиэтилдекстрана	полиаргинин 10 - 20 кДа/ хондроитинсульфат, полиаспаригиновая кислота 15-50 кДа, полиглутаминовая кислота 15-50 кДа, декстрансульфат 10 кДа	БСА (включение в капсулы)	[283]
	микрокапсулы на матрице ватерита	БСА/ таниновая кислота	лактоферрин (адсорбция, соосаждение)	[66]
	микрокапсулы на матрице ватерита и функционализированного ватерита	пепсин/ таниновая кислота	лактоферрин	[53]
	нанокапсулы на липосомах	инсулин/ хитозан 15, 50 - 190, 190 - 300 кДа	инсулин	[284]

1	2	3	4	5
Глюкоза	микрочастицы на кристаллах белка	глюкозооксидаза/ каталаза	инсулин	[76]
	микрокапсулы на матрице $MnCO_3$	глюкозооксидаза/ каталаза	инсулин	[75]
Хитозаназа	полые микрокапсулы на матрице ватерита	декстрансульфат 500 кДа/ хитозан 650 кДа	БСА	[285, 286]
Протеаза	полые микрокапсулы на матрице ватерита	декстрансульфат 10 кДа/ полиаргинин 70 кДа	овальбумин (соосаждение)	[287]
Гиалуронидаза	полые микрокапсулы на гелях гиалуроновой кислоты	гиалуроновая кислота/ полилизин 10 - 20 кДа	БСА (включение в капсулы)	[288]

Микрокапсулы формировали на матрице ватерита с соосажденными или адсорбированными бычьим сывороточным альбумином (БСА) или пероксидазой хрена путем послойной адсорбцией декстрансульфата и полиаргинина [281, 282] или полилизина и хондроитинсульфата [86], а далее изменением рН регулировали высвобождение белков. рН-чувствительное высвобождение было продемонстрировано для белков, загруженных в готовые матричные микрокапсулы, полученные на меламинаформальдегидных сферах послойной адсорбцией альгината и протамина [70] или на сферах гидроксиэтилдекстрана с помощью полиаргинина и различных полианионов (хондроитинсульфата, декстрансульфата, полиаспарагиновой кислоты или полиглутаминовой кислоты) [283]. Особый интерес вызывали микрокапсулы, полученные послойной адсорбцией биополиэлектролитов, для пероральной доставки терапевтически важных белков - рекомбинантных инсулина человека [284, 289, 290 284] и лактоферрина [53, 66].

Примером воздействия отдельных веществ может служить изменение под действием глюкозы проницаемости полиэлектролитной оболочки, состоящей из глюкозооксидазы и каталазы [75, 76]. На кристаллах инсулина формировали 5 бислоев из глюкозооксидазы и каталазы, дополнительно обрабатывая каждый бислой сшивающим агентом. Имобилизованные ферменты

сохраняли активность, а микрокапсулы оставались стабильными при рН 7,4. При помещении микрочастиц в раствор глюкозы протекали сопряженные реакции:



Накопление глюконовой кислоты вызывало уменьшение локального рН в микрочастицах, изменение проницаемости полиэлектrolитной стенки и увеличение растворимости инсулина, что приводило к высвобождению гормона со скоростью, пропорциональной концентрации глюкозы.

Присутствие в оболочке биополимеров, служащих субстратами для отдельных ферментов, делает микрочастицы чувствительными к появлению таких ферментов в окружающей среде, изменяя проницаемость полиэлектrolитной оболочки по отношению к белкам. Добавление хитозаназы (N-ацетилглюкозаминогидролаза хитозана) приводило к деградации мультислойной полиэлектrolитной стенки микрокапсул, состоящей из декстрансульфата и хитозана, и высвобождению альбумина, включенного в микрочастицы [285, 286]. Аналогичный эффект наблюдали при воздействии гиалуронидазы на микрокапсулы, полученные послойной адсорбцией гиалуроновой кислоты и полилизина [288]. Расщепление внутриклеточными протеазами полиаргинина, входящего в состав оболочки микрокапсул в паре с декстрансульфатом, повышало проницаемость полиэлектrolитной стенки для альбумина, предварительно включенного в частицы [287]. Микрокапсулы из декстрансульфата и полиаргинина деградировали под действием протеаз клеток почек макаки VERO-1 [291].

Интересен пример включения в состав микрокапсул проназы R, представляющей собой смесь протеаз [292]. ДНК и проназу R соосаждали в микросферы ватерита, формировали 7 монослоев полиаргинина и полиаспарагиновой кислоты и растворяли карбонатные ядра с помощью ЭДТА. При помещении микрокапсул в нейтральные среды проназа разрушала стенку капсул, высвобождая ДНК. В зависимости от количества фермента, включенного в микросферы ватерита, время жизни микрокапсул варьировалось от нескольких минут до нескольких дней.

К внешним физическим факторам, способным вызвать высвобождение БАВ из полиэлектrolитных микрочастиц, относили действие температуры, света, ультрафиолета, лазера, ультразвука, радиации, магнитного поля и механических деформаций [81, 280]. Важной отличительной чертой большинства физических факторов является дистанционное воздействие, которое обеспечивает изменение полиэлектrolитных частиц и высвобождение белков в определенное время в нужном месте. Для решения проблемы высвобождения белков под действием физических факторов разрабатывали композитные капсулы, содержащие элементы, чувствительные к соответствующим дистанционным воздействиям (например, магнитные частицы, металлы и т.д.).

1.1.1. Применение частиц для направленной доставки

В публикациях последних лет особое внимание уделяется использованию мультислойных полиэлектролитных капсул для направленной доставки лекарств в раковые опухоли [293-296].

Для злокачественных опухолей, наряду с сосудистыми изменениями, характерны высокая скорость метаболизма, недостаточность снабжения кислородом, активный гликолиз с последующим повышением концентрации лактата, приводящие к понижению значения pH по сравнению с окружающими здоровыми тканями. pH чувствительные полиэлектролитные частицы использовались для доставки лекарственных веществ в гипоксическую и слабокислую среду опухолей (pH 6,4 - 6,8 [297]), а также внутриклеточного высвобождения лекарств в кислых эндосомах и лизосомах (pH 4,5 - 5,5) [298-300]. Отмечалось, что раковые клетки по сравнению с нормальными клетками имеют более отрицательный поверхностный заряд из-за повышенной экспрессии сиаловой кислоты [301] и присутствия большого количества сульфата гепарина [302], поэтому частицы для направленной доставки в новообразования покрывали поликатионами, в том числе полилизинном [303].

Для пассивной доставки использовали явление повышенной проницаемости и самопроизвольного накопления опухолями полиэлектролитных наночастиц размером 50 - 200 нм [304]. Пегилирование внешнего слоя обеспечивало продление времени циркуляции полиэлектролитных наночастиц в кровотоке [305].

Для активной доставки внешний полиэлектролитный слой модифицировали лигандами, нацеленными на специфические рецепторы опухолевых клеток. Для нацеливания на фолатные рецепторы, повышено экспрессируемые раковыми клетками, использовали наночастицы, полученные послойной адсорбцией карбоксиметилцеллюлозы, казеина и фолиевой кислоты, которые избирательно поглощались клеткам меланомы MEL-39 [306]. Наночастицы, сформированные с помощью хитозана, альгината и конъюгата фолиевой кислоты с ПЭГ, специфично связывались с клеточной линией гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 [307-309]. Полистирольные наносферы, покрытые полилизинном и гиалуроновой кислотой, обладающей избирательным действием к рецепторам гликопротеина CD 44 опухолей молочной железы и яичников, в 4 раза больше накапливались в клетках карциномы молочной железы по сравнению со здоровыми тканями [310]. При значении pH опухоли 6,0, отличающегося от pH 7,4 нормальных тканей, такие частицы набухали в 2,5 раза, что способствовало выделению противораковых веществ. Для направленной доставки в полиэлектролитные частицы включали полипептид аргинин-глицин-аспартат, специфически связывающейся с интегрином $\alpha\beta_3$, образующемся на поверхности мембран опухолевых клеток поджелудочной железы [311], или аптамер нуклеиновой кислоты AS1411, нацеленный на нуклеолин, повышено экспрессируемый раковыми клетками печени [312].

1.4.4. Заключение к разделу 1.4.

Несмотря на значительный прогресс использования послойной адсорбции полиэлектролитов для капсулирования белков и ферментов вопросы масштабирования, стандартизации, получения и хранения стабильных препаратов остаются открытыми, что может препятствовать их широкому использованию в различных областях.

Стимул-чувствительность на воздействие различных химических, биологических и физических факторов позволяет использовать мультислойные полиэлектролитные частицы для доставки БАВ. рН-чувствительное высвобождение капсулированных белковых препаратов открывает перспективы применения биополиэлектролитных частиц для пероральной доставки терапевтически важных белков, однако нуждается в подтверждении их биологического действия *in vivo*.

Одновременное использование нескольких подходов при послойной адсорбции полиэлектролитов для включения белковых и противораковых препаратов позволяет создавать комбинированные и многофункциональные частицы. Включение в мультислойные частицы определенных биополимеров, антител или их конъюгатов может способствовать высвобождению целевых продуктов в ответ на изменение внешних условий или вблизи ткани, служащей мишенью воздействия, обеспечивая адресную доставку лекарственных препаратов.

1.5. Постановка задачи и обоснование объектов исследования

Несмотря на успехи в области исследований послойной адсорбции полиэлектролитов, некоторые ключевые моменты различных подходов микро- и нанокапсулирования белков, а также вопросы стабильности препаратов и сохранения активности ферментов остаются недостаточно изученными, что препятствует широкому использованию полиэлектролитных конструкций в различных областях. Обзор литературы выявил интерес к созданию наноструктурированных матриц с высоким содержанием белковых препаратов, пригодных для последующей послойной адсорбции полиэлектролитов. Продолжается поиск биополимеров, способных придать новые свойства мультислойным полиэлектролитным композициям и повысить биодоступность лекарственных препаратов при различных путях введения. Одновременное использование разнообразных подходов для включения белков при послойной адсорбции полиэлектролитов позволяет создавать комбинированные и многофункциональные мультислойные частицы, перспективные для стимул-чувствительной, пролонгированной и направленной доставки БАВ. Однако остается открытым ряд вопросов, связанных с включением и сохранением активности белков и ферментов в микросферах ватерита и в мультислойные полиэлектролитные капсулы, полученных на их основе. Активно изучаются гибридные сферы ватерита, сформированные в присутствии биополимеров и обладающие новыми физико-химическими свойствами,

способствующими лучшему включению и удерживанию положительно заряженных БАВ. Природный гликопротеин муцин может быть использован для послойной адсорбции полиэлектролитов и придания препаратам мукоадгезивных свойств.

Цели работы заключались в разработке направления, связанного с микрокапсулированием белков с помощью техники послойной адсорбции полиэлектролитов с использованием наноструктурированных матриц, и в развитии подходов к получению мультислойных рН-чувствительных контейнеров для доставки белков или стабильных биореакторов с высоким сохранением активности ферментов.

Для решения задачи получения новых стабильных наноструктурированных матриц с высоким содержанием белка было предложено использовать высаливание белка и формирование нерастворимых полиэлектролитных комплексов белка (нПЭК). Процесс высаливания часто используется при выделении и очистке белковых препаратов. Полиэлектролитные комплексы белков применяли при конструировании различных биокаталитических систем и для стабилизации ферментов [313]. В отличие от регулярных полиэлектролитов, образование нерастворимых стехиометрических полиэлектролитных комплексов для белков малохарактерно из-за пространственной разделенности зарядов, поэтому для их полной компенсации необходимо использовать низкомолекулярный электролит или избыток высокомолекулярного полиэлектролита, который обычно характеризуется высокой плотностью заряда [313].

В качестве растворимых матриц с узким распределением по размеру выбраны меламинформальдегидные микросферы и микросферы ватерита, на основе которых возможно получение матриксных и полых мультислойных микрокапсул.

Для полиэлектролитных микрокапсул, полученных на различных матрицах, будут изучены строение, физико-химические свойства, различные подходы для включения белков и сохранения активности ферментов, обсуждены возможности применения.

Для послойной адсорбции выбраны хорошо известные природные, биосовместимые и биodeградируемые полиэлектролиты и их производные с разной плотностью заряда, в том числе высокомолекулярные, применение которых должно способствовать проявлению мукоадгезивных свойств частиц. В качестве полианинов предпочтение отдано полисахаридам и их производным (рис. 1.16): декстрансульфату разных молекулярных масс [314], альгинату [315], хитозансульфату [316], а в качестве поликатионов (рис. 1.16) - хитозану разных молекулярных масс [317] и сильноосновному полипептиду протамину из молок лосося (5 кДа, рI 11) [318], обладающему низкой токсичностью по сравнению с синтетическими полипептидами.

Впервые для включения в микросферы ватерита и послойной адсорбции в качестве поликатиона будет исследовано применение гликопротеина муцина из желудка свиньи. Для отдельных модельных исследований будут использована распространенная пара синтетических

полимеров поли(стиролсульфонат) натрия (ПСС, рис. 1.16 Г) и поли (аллиламин гидрохлорид) (ППА, рис. 1.17 Б), образующих устойчивый полиэлектролитный комплекс.

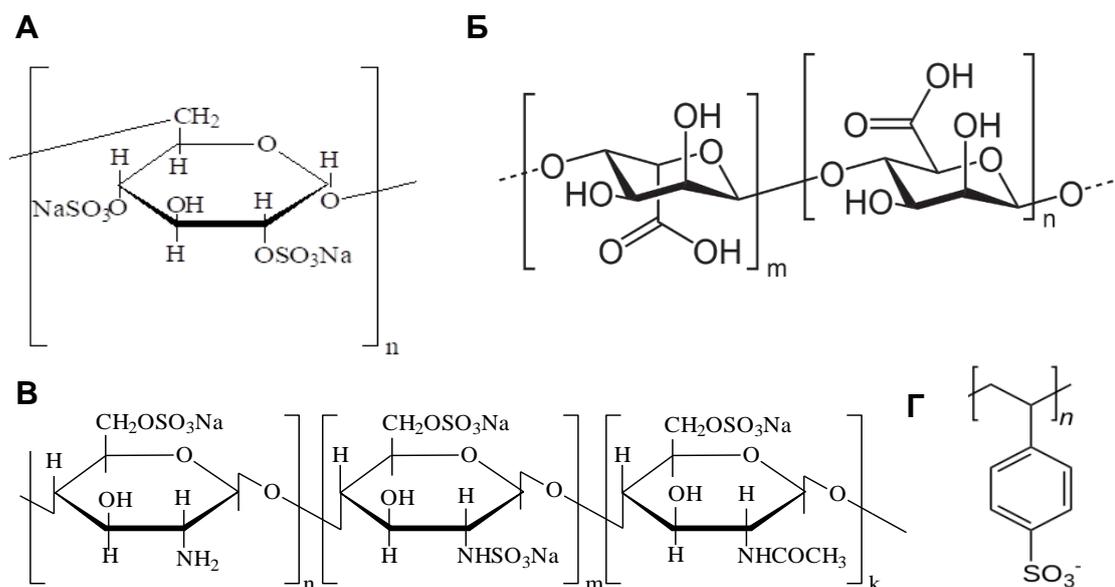


Рис. 1.16. Структурные формулы декстрансульфата (А), альгиновой кислоты (Б), хитозансульфата (В) и полистиролсульфоната (Г).

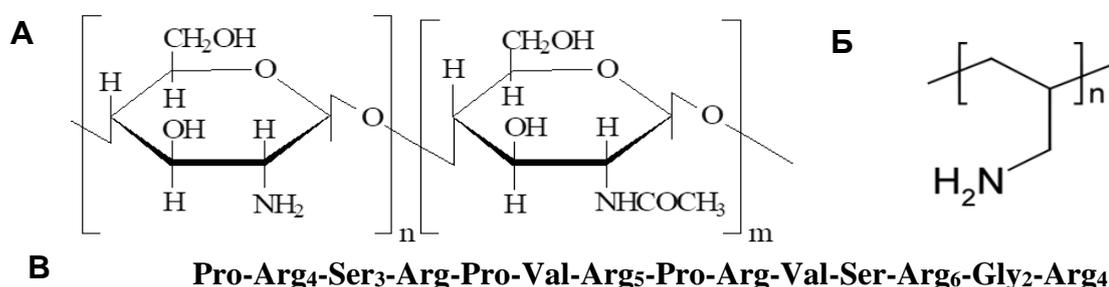


Рис. 1.17. Структурные формулы хитозана (А), полиаллиламина (Б) и аминокислотная последовательность протамина (В).

При выборе белковых препаратов для микрокапсулирования исходили из следующих предпосылок: 1) белки, полипептиды и ферменты должны быть подробно изученными, т.е. известны их аминокислотный состав, пространственная структура, рI, размер молекулы, механизм катализа; 2) белковые препараты уже использовались в качестве лекарственных средств, а их капсулирование перспективно; 3) ферменты или их совокупность востребованы для проведения важных реакций, в том числе много многостадийных. Таким критериям соответствовали 16 выбранных белковых препаратов (табл. 1.8).

Белки: альбумин из куриных яиц (овальбумин) и сыворотки человека (А), инсулины, отличающиеся аминокислотными заменами в Б-цепи: инсулин свиньи (Pro^{B28}, Lys^{B29}, Ala^{B30}) и рекомбинантный инсулин человека (Pro^{B28}, Lys^{B29}, Thr^{B30}) в виде гексамеров, мономерные,

быстродействующие рекомбинантные инсулины аспарт (Asp^{B28} , Lys^{B29} , Thr^{B30}) и лизпро (Lys^{B28} , Pro^{B29} , Thr^{B30}).

Ферменты, относящихся к различным классам: протеазы - трипсин и химотрипсин, входящие в состав препаратов для улучшения пищеварения и также местного применения в том числе для очистки раневых поверхностей; четыре оксидоредуктазы - каталаза, глюкозооксидаза, пероксидаза и супероксиддисмутаза, активно используемые для биомедицинских исследований и применений.

Таблица 1.8. Характеристика белковых препаратов, использованных в исследовании

Название	Сокращение	pI	M _w , кДа
Полипептиды			
Протамин из молок лосося	Пр	11	5
Белки			
Альбумин из куриных яиц (Овальбумин)		4,7	45
Альбумин человека сывороточный (А)	А	4,7	68
Инсулин аспарт (Asp^{B28} , Lys^{B29} , Thr^{B30})	аспарт	5,1	5,8 (34,8)
Инсулин лизпро (Lys^{B28} , Pro^{B29} , Thr^{B30})	лизпро	5,35	5,8 (34,8)
Инсулин человека (Pro^{B28} , Lys^{B29} , Thr^{B30})	Инс _{чел}	5,35	5,8
Инсулин свиньи (Pro^{B28} , Lys^{B29} , Ala^{B30})	Инс _{св}	5,5	5,8
Оксидоредуктазы			
Супероксиддисмутаза	СОД	4,5	32
Каталаза	Кат	5,4	250
Глюкозооксидаза		5,5	160
Пероксидаза из корней хрена		8,8	44
Протеазы			
α -Химотрипсин	Хим	8,8	25
Трипсин		10,5	24
Ингибиторы протеаз			
Ингибитор трипсина из утиных яиц (Овомукоид)		3,8	28
Ингибитор Баумана Бирк	ИББ	4,2	8
Апротинин	Апр	10,5	6,5
Гликопротеины			
Муцин из желудка свиньи (М)	М	3 - 4	≈600
Лактоферрин из женского молока	ЛФ	11,5	73

Три белковых ингибитора протеолитических ферментов из различных источников: овомукоид из утиных яиц, обладающий антиканцерогенными свойствами соевый ингибитор Баумана-Бирк (ИББ) [С32, С46] и перспективный для профилактики вирусных инфекции, в том числе COVID-19, апротинин [С46]. Кроме этого, был использован разработанный автором, препарат «Инсол», представляющий собой экстракт из сои, обогащенный ИББ и ингибитором

трипсина типа Кунитца (ИТК), перспективный для профилактики онкологических заболеваний [С32].

В качестве гликопротеина - лактоферрин из молока человека, обладающий бактериостатическим, бактерицидным, фунгицидным, противовирусным, детоксицирующим действием [С28] и муцины из желудка свиньи и околоушных желез быка.

При получении комплексных частиц в микросферы ватерита будет микрокапсулирован антрациклиновый антибиотик доксорубин (Докс, 544 Да, рКа 8,6), состоящий из полициклического антрациклинового ядра и углеводного остатка даунозамина (рис. 1.18), содержащего аминогруппу, который на протяжении 30 лет остается одним из наиболее часто применяемых противоопухолевых лекарственных средств [319].

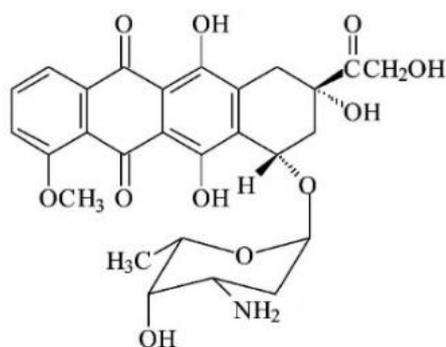


Рис. 1.18. Структурная формула доксорубина.

Доксорубин способен накапливаться как в пораженных, так и в здоровых клетках организма поэтому многочисленный исследования направлены на разработку подходов, позволяющих увеличить избирательность его действия и биодоступность.

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Материалы и реактивы

Белки и гликопротеины

Альбумин бычий сывороточный (БСА), «Sigma-Aldrich», США

Альбумин человеческий сывороточный (А), Fraction V (96-99%), «Sigma», США

Апротинин из легких быка (Апр), препарат «Ингипрол» (Апр), ПО «Белмедпрепараты» (Белоруссия), имеющий 46 % активного вещества по массе

Глюкозооксидаза из *Aspergillus niger*, «Sigma», США

Ингибитор трипсина и химотрипсина из сои типа Баумана-Бирк (ИББ), «Sigma» (США), имеющий 55 % активного вещества по массе

«Инсол» – экстракт из сои, содержащий 90 % белка и обогащенный ингибиторами ИББ и трипсина типа Кунитца (экстракт ИББ/ИТК) [С38]

Инсулины из различных источников: инсулин человека рекомбинантный (Инс_{чел}) в виде цинковой соли (29 Ед/мг), инсулин аспарт, инсулин лизпро – препараты ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и И.Ю. Овчинникова РАН; инсулин свиньи (Инс_{св}) в виде цинковой соли препарат «Белмедпрепараты», Белоруссия; инсулин бычий, меченный флуоресцеин 5-изотиоцианатом (Инс-ФИТЦ), «Sigma», США

Каталаза (Кат) из печени быка «Sigma», США

Лактоферрин (ЛФ) из женского молока в виде апо-формы - препарат «Лапрот», ФГУ МНИОИ им. П.А. Герцена

Овальбумин из куриных яиц, «Fluka», Швейцария

Овомукоид, обессоленный препарат из утиных яиц «Овомин для инъекций», ПО «Белмедпрепараты», Белоруссия, имеющий 51 % активного вещества по массе

Пероксидаза (ПОД) из корней хрена, «Sigma», США

Пепсин из желудка быка, «Sigma», США, 28,4 Ед/мг

Протамин сульфат из молок лосося (Пр), «Sigma», США

Супероксиддисмутаза (СОД) из бычьих эритроцитов, «Sigma», США и человека рекомбинантная, «Ферментные технологии», Россия

Трипсин из поджелудочной железы быка, «Fluka», Швейцария, имеющий 61 % активных центров

α -Химотрипсин из поджелудочной железы быка (Хим), «Fluka, Biochemica», Германия, имеющий 48 % активных центров

Муцины из желудка свиньи тип III (М) и бычьих подчелюстных желез тип I-S, «Sigma», США

Микрочастицы

Меламинформальдегидные микросферы (МФ-микросферы) диаметром $5,12 \pm 0,15$ мкм в виде 20 %-ной суспензии, «Microparticles GmbH», Германия

Поликатионы

Поли (аллиламин гидрохлорид) (ПАА), 50 кДа, «Aldrich», Германия

Хитозаны различных молекулярных масс: 22 кДа (Хит₂₂), степень деацетилирования (СД) 85 % «Российское Хитиновое Общество»; 150 кДа (Хит₁₅₀), СД 75 - 85 %, 400 кДа (Хит₄₀₀), СД 85 %, 600 кДа (Хит₆₀₀), СД 85 %, препараты фирмы «Fluka», Швейцария

Полинионы

Альгинат натрия (Алг) средней степени вязкости, «Sigma», США

Декстрансульфат натрия (ДС) различных молекулярных масс: 5 кДа (ДС₅), 100 кДа (ДС₁₀₀), 500 кДа (ДС₅₀₀), препараты «Fluka», Швейцария

Поли (стиролсульфонат) натрия (ПСС), 70 кДа, «Aldrich», Германия

Хитозансульфат, 150 кДа (ХС), Московский государственный текстильный университет им. А.Н. Косыгина

Субстраты

Амплекс красный (Amplex Red), «Molecular Probes», США; D-Глюкоза, пероксид водорода 30 %, 2,2'-азино-бис-3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота (АБТС), N-бензоил-L-аргинина паранитроанилид (БАПНА), N-бензоил-L-аргинина этиловый эфир (БАЭЭ), N-бензоил-L-тирозина паранитроанилид (БТПНА), N-бензоил-L-тирозина этиловый эфир (БТЭЭ), «Sigma», США

Красители

6-карбоксифлуоресцеин, родамин В изотиоцианат, флуоресцеин-5-изотиоцианат (ФИТЦ), «Sigma», США

Прочие реактивы и препараты

Доксорубин гидрохлорид (Докс) – субстанция «Dian Jiang Chong», Китай

Люминол (Люм) и люцигенин (Люц), «Sigma», США

Ортофталевый альдегид и N-ацетил-L-цистеин, Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского

Форбол 12-мирилат-13-ацетат (ФМА, 99%), «Sigma», США

Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), «Sigma», Германия

Растворы Histopaque плотностью 1,077 и 1,119 г/мл, «Sigma», США

Реактив Фолина-Чокальтеу, «Merck», Германия

Хроматографические стандарты, «Boehringer Combitex Proteins II», Германия

Сефадексы G-50sf, G-75sf, G-100, «LKB-Pharmacia», Швеция

Среда Кребса-Рингера, «Sigma», США

Тест-полоски OneTouch для определения уровня глюкозы в крови, LifeScan Johnson&Johnson, США

Диагностический набор для определения глюкозы «Глюкоза-Агат», ООО «Агат-Мед», Россия

Иммуноферментный набор для определения инсулина человека «Rapid Insulin AccuBind ELISA Kits», «Monobind», США

Кровь здорового добровольца из локтевой вены (забор крови в вакутейнер с ЭДТА)

Остальные реактивы имели марки х.ч. и о.с.ч.

2.2. Получение и очистка препаратов

2.2.1. Получение очищенного муцина

30 мл раствора 5 мг/мл коммерческого муцина хроматографировали на колонке со сефадексом G-200 (2,5x35 см) в растворе аммиака, pH 9,0 (0,5 мл/мин), контролируя на выходе поглощение при длинах волн 214, 260 нм (рис. 2.1). Собирали фракции, в которых муцин определялся по методу Шиффа (A_{555}) [320], и высушивали лиофильно.

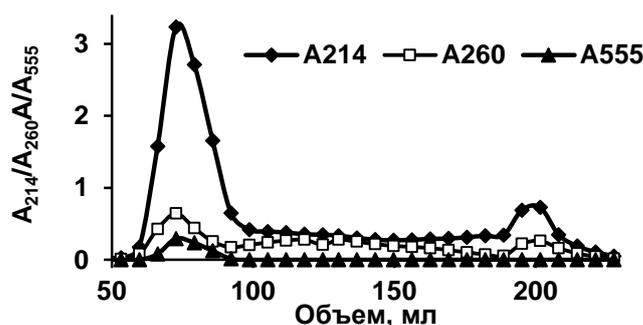


Рис. 2.1. Гель-фильтрация на сефадексе G-200 муцина из желудка свиньи для получения очищенного муцина.

2.2.2. Получение десиалированного муцина

0,3 мг/мл муцина в 0,01 М HCl инкубировали 3 ч при 80 °С. Раствор хроматографировали на сефадексе G-200 (см. 2.2.1). Содержание сиаловых кислот, определенное по методу Гесса [321], составило $2,30 \pm 0,10$ и $0,41 \pm 0,05$ % для исходного и десиалированного муцина соответственно.

2.1.1.3. Получение препаратов, меченных флуоресцентной меткой

Для модификации белков к раствору 2 мг/мл белка в 0,5 М карбонатном буфере с pH 9 прибавляли раствор 0,1 мг/мл ФИТЦ в карбонатном буфере до достижения молярного соотношения белок : ФИТЦ равного 5 : 1. Полученный раствор инкубировали 4 ч и диализовали против воды и 50 мМ трис-буфера с pH 7,0.

Для модификации муцина 10 мл раствора 5 мг/мл муцина в 0,5 М карбонатном буфере с pH 9,0 смешивали с 1 мл раствора 1 мг/мл ФИТЦ в диметилформамиде и инкубировали 24 ч при 4 °С. Раствор хроматографировали на сефадексе G-200, как описано 2.1.1. Степень модификации

свободных аминогрупп в муцине-ФИТЦ, определенная титрованием тринитробензолсульфоновой кислотой [322], составила 17 ± 2 % относительно очищенного муцина.

Для модификации каталазы 2 мл раствора 5 мг/мл каталазы в 0,5 М карбонатном буфере с рН 9,0 смешивали с 40 мкл 17,5 мг/мл раствора родамина В до достижения мольного соотношения каталаза : родамин равного 1 : 3. Смесь перемешивали 2,5 ч и диализовали против воды.

2.3. Методы анализа микрочастиц

2.3.1. Световая оптическая микроскопия

Размер и морфологию микрочастиц в суспензии анализировали световой оптической микроскопией с использованием Opton III, Carl-Zeiss, Olympus IX 51. Для определения размера измеряли 80 частиц и рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение (рис. 2.2).

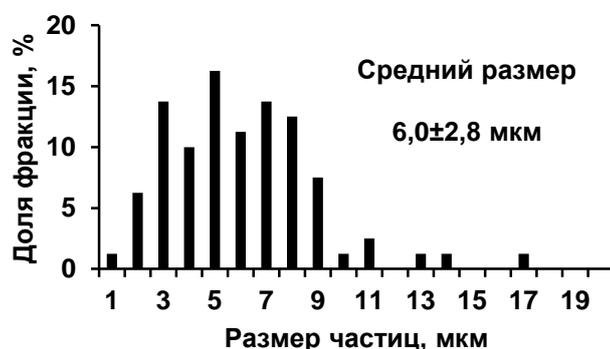


Рис. 2.2. Пример распределения микрочастиц по размерам согласно СОМ.

2.3.2. Сканирующая электронная микроскопия

Размер и морфологию микрочастиц изучали сканирующей электронной микроскопией (СЭМ) с помощью растровых электронных микроскопов Zeiss DSM 40, Merlin Carl Zeiss (Zeiss, Германия), Leo Supra 50VP с ускоряющим напряжением 3 - 5 кВ при увеличении 5000 - 150000.

2.3.3. Конфокальная флуоресцентная сканирующая микроскопия

Конфокальную флуоресцентную сканирующую микроскопию (КЛСМ) проводили с использованием микроскопа «Leica TCS SP2» на базе платформы «Leica Aristoplan».

2.3.4. Рамановская спектроскопия

Рамановские спектры снимали с использованием конфокального микроскопа «CRM200» (WITec, Германия) с пьезосканером (P-500, Physik Instrumente) и объективом (Nikon). В типичном эксперименте циркулярно-поляризованный лазер (CrystaLaser, $\lambda=32$ нм) фокусировали на материале с размером пятна, ограниченного дифракцией ($\sim \lambda/2$). Для проведения рамановского спектроскопического анализа в микрочастице фокусировали лазер точно внутри или на краю микрокапсулы.

2.3.5. Динамическое светорассеяние

Измерение электрокинетического потенциала поверхности (ζ -потенциал) и гидродинамического радиуса частиц и биополимеров проводили динамическим светорассеянием

(ДЛС) на установках «Malvern Zetasizer II» и «Zetasizer Nano ZS». Данные по электрофоретической подвижности частиц обрабатывали с помощью программы Dispersion Technology Software version.

2.3.6. Круговой дихроизм

Спектры кругового дихроизма (КД) получали на спектрометре Jasco J-815 (Jasco, Япония). Анализ спектров производили с помощью программы для определения вторичной структуры белков по КД спектрам (CDNN) (<http://gerald-boehm.de/download/cdnn>), основываясь на рентгеноструктурных данных для каталазы, взятых из банка данных 3-D структур белков и нуклеиновых кислот.

2.3.7. Рентгенофазовый анализ

Рентгенофазовый анализ (РФА) микросфер ватерита осуществляли на рентгеновском дифрактометре Bruker D8 Advance, оснащенный кремниевым дрейфовым детектором. Полученные рентгенограммы использовали для определения фазового состава образцов, используя формулу:

$$\frac{I_c^{104}}{I_v^{110}} = 7.691 * \frac{X_c}{X_v}, \quad (2.1)$$

где 7,691 - константа пропорциональности; I_c^{104}/I_v^{110} - отношение интенсивностей пиков кальцита ($hkl = 104$) и ватерита ($hkl = 110$); X_c/X_v - отношение мольных долей кальцита и ватерита в образцах.

2.3.8. Адсорбция-десорбция азота по методу Брунауэра-Эммета-Теллера

Исследование пористой структуры образцов проводили методом низкотемпературной адсорбции азота на установке ASAP-2000 фирмы Micromeritics. Предварительно образцы подвергали вакуумной обработке при комнатной температуре до остаточного давления $2 \cdot 10^{-6}$ бар. Изотермы сорбции N_2 при -196 °C регистрировали в виде зависимостей объема сорбированного азота при н.у. ($см^3/г$) от относительного давления p/p_0 , где p_0 - давление насыщенных паров азота при -196 °C. С помощью стандартного пакета программ, входящих в комплектацию прибора, производили расчет пористых характеристик образцов. Площадь удельной поверхности оценивали методом Брунауэра-Эммета-Теллера (БЭТ), объем микропор определяли методом t -plot. Размер пор рассчитывали с помощью метода Barrett-Joyner-Halenda.

2.3.9. ИК-Фурье спектроскопия

Регистрацию ИК-спектров в режиме нарушенного полного внутреннего отражения проводили на приборе Bruker Tensor 27 с термостатируемой ZnSe ячейкой Bio-ATR II при температуре 22 °C. Спектры получены в диапазоне $900 - 3000$ $см^{-1}$ со спектральным разрешением 1 $см^{-1}$. Спектральные данные обрабатывались с использованием программного обеспечения Bruker Opus 7.5. Обработка спектров включала в себя спрямление базовой линии, нормализацию по области Амид I, сглаживание по протоколу Савицкого-Голая (21 точка).

2.4. Методы анализа отдельных веществ

2.4.1. Спектрофотометрическое определение

Концентрацию белка в растворах определяли: по поглощению при длине волны 280 нм, по методу Лоури [323] или с помощью хроматографии (см. 2.4.2.), используя градуировочные графики для отдельных белков. Концентрацию муцина в растворах, не содержащих другие белки, определяли по поглощению при длине волны 214 или 260 нм. В присутствии белков концентрацию муцина анализировали по методу Шиффа [320] или хроматографически (2.4.2.). Концентрацию декстрансульфата в растворах определяли по методу Дюбуа [324].

Хитозан определяли по разработанному автором методу с использованием ортофталевого альдегида [С30]. Хитозаны растворяли в 0,01 М HCl и доводили pH раствора до 3,0. D-глюкозамин растворяли в воде до концентрации 1 мг/мл. Белок растворяли в 0,2 М боратном буфере, pH 8,9, до концентрации 1 мг/мл. Декстрансульфат растворяли в 0,2 М боратном буфере, pH 8,9, до концентрации 5 мг/мл. Суспензии микрочастиц, состоящих из белка, хитозана и декстрансульфата, суспендировали в универсальном буфере с pH 12, после чего раствор разбавляли 0,2 М боратным буфером, pH 8,9, до достижения конечной концентрации белка 0,1 - 0,2 мг/мл (концентрации хитозана 0,02 - 0,05 мг/мл). Для приготовления реагента смешивали 5 мл 0,2 М боратного буфера, pH 8,9, 0,2 мл 0,11 М раствора ортофталевого альдегида в этаноле и 0,2 мл 0,071 М N-ацетил-L-цистеина в этаноле. В качестве раствора сравнения использовали смесь, состоящую из 0,5 мл 0,2 М боратного буферного раствора, pH 8,9, содержащего 0,25 М NaCl, и 0,5 мл реагента. Для анализа смешивали 0,5 мл образца в 0,25 М NaCl, 0,5 мл реагента и через 1 ч измеряли поглощение при длине волны 340 нм. По предварительно измеренной концентрации белка с использованием градуировочного графика по белку (рис. 2.3 А) определяли вклад белка в поглощение и вычитали его из полученного значения поглощения. Далее по градуировочному графику для хитозана (рис. 2.3 Б) определяли концентрацию полисахарида в растворе.

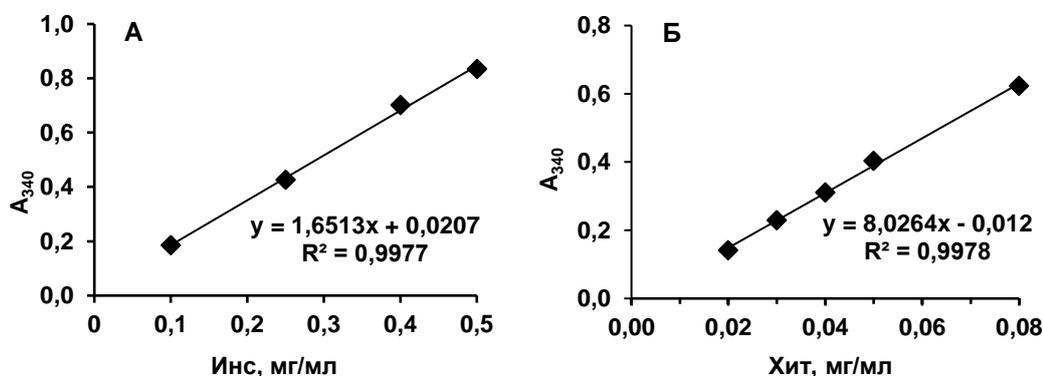


Рис. 2.3. Градуировочные графики для определения концентрации хитозана с использованием ортофталевого альдегида: А - инсулин, Б - хитозан 400 кДа.

2.4.2. Аналитическая гель-хроматография

Аналитическую гель-хроматографию белков и муцина проводили на колонке Biofox 17 SEC (8×300 мм) в растворе 0,15 М NaCl или в фосфатно-солевом буфере с рН 7,4 при объемной скорости 0,5 мл/мин. Объем пробы составлял 20 мкл. На выходе из колонки регистрировали поглощение при длинах волн 214, 260, 280 и 480 нм. Предварительно колонку калибровали по растворам очищенного муцина (0,01-0,1 мг/мл) и отдельных белков (ИББ, 8 кДа; цитохром С, 12,4 кДа, карбоангидраза, 29 кДа; бычий сывороточный альбумин, 66 кДа; амилаза, 200 кДа). По хроматограммам анализируемых растворов (рис. 2.4) определяли при длине волны 214 нм высоту пиков, соответствующих муцину (время удерживания 9,3 - 9,4 мин) или белкам, и рассчитывали их концентрации в растворах с использованием градуировочных кривых

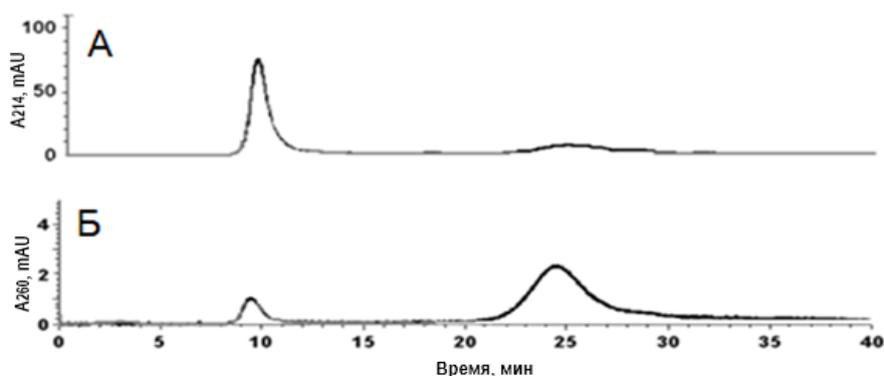


Рис. 2.4. Типичная аналитическая гель-фильтрация муцина из желудка свиньи тип III (0,1 мг/мл) на колонке Biofox 17 SEC: А - поглощение при 214 нм, Б - поглощение при 260 нм.

2.4.3. Определение активности белков

2.4.3.1. Определение активности трипсина

Активность трипсина определяли с использованием N-бензоил-L-аргинина этилового эфира (БАЭЭ) [325]. В кювете смешивали 0,1 мл 0,1 мг/мл раствора трипсина в 0,001 М HCl и 0,7 мл 0,05 М трис-буфера, рН 8,0. К смеси добавляли 0,2 мл 0,514 мг/мл раствора БАЭЭ в 0,05 М трис-буфере, рН 8,0, и регистрировали изменение поглощения при 253 нм.

Активность трипсина рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{\Delta_{253} \times 1000}{808 \times 0,1 \times 0,1} \text{ Ед/мг}, \quad (2.2)$$

где Δ_{253} - прирост оптической плотности при длине волны 253 нм за 1 мин; 1000 - коэффициент пересчета ммоль в мкмоль; 808 - отношение молярных коэффициентов экстинкции БАЭЭ к N-бензоил-L-аргинину; 0,1 - концентрация раствора трипсина, мг/мл; 0,1 - объем раствора трипсина в кювете, мл.

Активность препарата трипсина составляла 9000 БАЭЭ Ед/мг.

2.4.3.2. Определение активности α -химотрипсина

Активность α -химотрипсина определяли с использованием в качестве субстрата N-бензоил-L-тирозина этилового эфира (БТЭЭ) [326] или N-бензоил-L-тирозина паранитроанилида (БТПНА) [327]. Для приготовления раствора субстрата 10 мг БТЭЭ растворяли в 3,1 мл метанола и добавляли 12,5 мл 0,05 М трис-буфера, рН 7,8. В кювете смешивали 0,1 мл 0,05 мг/мл раствора α -химотрипсина и 0,7 мл 0,05 М трис-буфера, рН 7,8. К смеси добавляли 0,2 мл раствора БТЭЭ и регистрировали изменение поглощения при 256 нм. Активность α -химотрипсина рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{\Delta_{256} \times 1000}{964 \times 0,1 \times 0,05} \text{ Ед/мг}, \quad (2.3)$$

где Δ_{256} - прирост оптической плотности при длине волны 256 нм за 1 мин; 1000 - коэффициент пересчета ммоль в мкмоль; 964 - отношение молярных коэффициентов экстинкции БТЭЭ к N-бензоил-L-тироzinу; 0,05 - концентрация раствора α -химотрипсина, мг/мл; 0,1 - объем раствора α -химотрипсина в кювете, мл.

Активность препарата химотрипсина составляла 39 БТЭЭ Ед/мг.

2.4.3.3. Определение активности ингибиторов протеаз

Для определения активности ингибиторов протеаз (ИП) в полиэлектролитных частицах проводили их разрушение смешиванием с универсальным буфером с рН 12,0 (0,02 М H_3PO_4 , 0,02 М CH_3COOH , 0,02 М H_3BO_3 + 0,1 М NaOH) в соотношении 1 : 10 и разбавлением через 1 мин 0,5 М трис-буфером, рН 7,8, до концентрации белка 0,01 мг/мл.

При определении активности по трипсину в кювету вносили 0,1 мл 0,1 мг/мл раствора фермента в 0,001 М HCl , 0,02 - 0,20 мл исследуемого раствора ингибитора протеаз, объем смеси доводили 0,5 М трис-буфером, рН 7,8, до 0,8 мл и инкубировали 10 мин при 25 °С. Далее в кювету вносили 0,2 мл 0,514 мг/мл раствора БАЭЭ в 0,5 М трис-буфере, рН 7,8, и регистрировали изменение поглощения при 253 нм.

При определении активности по химотрипсину в кювету вносили 0,1 мл 0,208 мг/мл раствора α -химотрипсина в 1 мМ HCl , 0,02 - 0,20 мл исследуемого раствора ингибитора протеаз, объем смеси доводили 0,5 М трис-буфером, рН 7,8, до 0,97 мл и инкубировали 10 мин при 25 °С. Далее в кювету вносили 0,03 мл 0,81 мг/мл раствора БТПНА в ацетонитриле и после перемешивания регистрировали изменение поглощения при 410 нм.

Для каждого объема исследуемого раствора определяли остаточную активность фермента как отношение тангенса угла наклона кривой изменения оптической плотности от времени к аналогичной величине свободного фермента. Строили зависимость остаточной активности фермента от объема добавленного раствора ингибитора протеаз и находили точку

эквивалентности ($V_{\text{эКВ}}$), в которой молярные концентрации фермента и ингибитора равны (рис. 2.5).

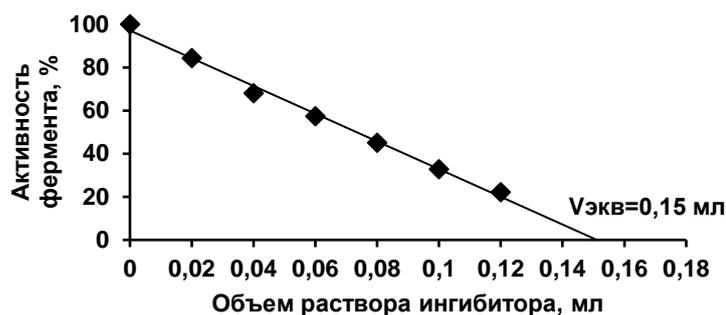


Рис. 2.5. Пример определения точки эквивалентности ($V_{\text{эКВ}}$) при анализе концентрации ингибитора протеаз.

Определяли концентрацию активного ингибитора протеаз (мг/мл) в растворе по формуле:

$$[ИП] = \frac{0,1 \times [E] \times A \times P \times M_I}{M_E \times V_{\text{эКВ}}}, \quad (2.4)$$

где 0,1 - объем раствора фермента в кювете, мл; [E] - весовая концентрация фермента в растворе (0,1 мг/мл); А - доля активного фермента (0,61); Р - разбавление анализируемого раствора ИП; M_I – молекулярная масса ингибитора протеаз, кДа; M_E - молекулярная масса протеазы; $V_{\text{эКВ}}$ - объем раствора ИП в точке эквивалентности, мл.

Сохранение активности капсулированного ингибитора протеаз определяли, как отношение процентного содержания активного ингибитора в микрочастицах к аналогичной величине для нативного ингибитора, взятого в том же количестве.

Активность овомукоида определяли по методу Какаде по ингибированию трипсина с использованием в качестве субстрата N-бензоил-L-аргинина паранитроанилид (БАПНА) [328].

2.4.3.4. Определение активности лактоферрина

Антиоксидантную активность лактоферрина определяли по ингибированию перекисного окисления липидов в гомогенате печени мышей. Степень окисления липидов оценивали по концентрации малонового диальдегида тиобарбитуровым методом [329]. Результаты выражали в процентах относительно контроля и представляли графически в системе координат: абсцисса - концентрация образца в пробе (моль/мл); ордината - процент ингибирования образования малонового диальдегида в пробе. По графикам определяли молярную концентрацию вещества, в которой лактоферрин ингибирует перекисное окисление липидов на 50 %.

2.4.3.5. Определение активности каталазы

Анализируемый раствор каталазы или суспензию микрочастиц разбавляли до концентрации фермента 0,005-0,010 мг/мл. Смешивали 0,92 - 0,97 мл 0,1 М фосфатного буфера pH 7,0, 0,03 - 0,080 мл разбавленного раствора фермента или суспензии частиц с ферментом, 0,10 мл 0,196 М H_2O_2 до достижения общего объема реакционной смеси 1 мл [330]. Измеряли в течение 30

сек поглощение при длине волны 240 нм. Падение оптической плотности за 1 мин составляло 0,03 - 0,07 о.е./мин. Активность (А, Ед/мл) и удельную активность каталазы (А_{уд}, Ед/мг) рассчитывали по следующим формулам:

$$A = \frac{\Delta A_{240} * 1000}{0,0436 * V_{al}} * P \quad (2.5)$$

$$A_{уд} = A/c, \quad (2.6)$$

где ΔA_{240} - прирост оптической плотности, о.е./мин; с - концентрация белка в исходном анализируемом растворе, мг/мл; V_{al} - объем аликвоты раствора каталазы в кювете, мкл; 0,043 - молярный коэффициент экстинкции пероксида водорода, $M^{-1}cm^{-1}$; P - разведение анализируемого раствора каталазы.

2.4.3.6. Определение активности пероксидазы

Анализируемый раствор пероксидазы или суспензию микрокапсул разбавляли до концентрации фермента 0,005 - 0,040 мг/мл. Определение активности пероксидазы проводили с использованием 2,2'-азино-бис-3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты (АБТС) или аминоантипирена [331].

Смешивали 0,905 - 0,925 мл 0,1 М ацетатного буфера, рН 5,0, 0,005 - 0,025 мл раствора пероксидазы (0,05 - 0,04 мг/мл) или суспензии микрокапсул, 0,020 мл раствора 8 мг/мл АБТС и 0,050 мл 0,5 % раствора H_2O_2 до достижения общего объема реакционной смеси 1 мл. Измеряли 1 мин поглощение при 403 нм. 1 единица активности пероксидазы (Ед) окисляла 1 мкмоль АБТС в мин.

Смешивали 0,81 - 0,83 мл 0,1 М фосфатного буфера с рН 7,0, 0,20 - 0,40 мл разбавленного раствора пероксидазы или суспензии микрокапсул, 0,10 мл 8 мМ аминоантипирена в 0,11 М растворе фенола и 0,50 мл 1 % раствора H_2O_2 до достижения общего объема реакционной смеси 1 мл. Измеряли 2 мин поглощение при 492 нм. Активность фермента (Ед/мл) рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{\Delta A_{492} * 1000}{0,00658 * V_{al}} * P, \quad (2.7)$$

где A_{492} - прирост оптической плотности, о.е./мин; V_{al} - объем аликвоты раствора фермента в кювете, мкл; 0,00658 - молярный коэффициент экстинкции, $M^{-1}cm^{-1}$; P - разведение анализируемого раствора пероксидазы.

2.4.3.7. Определение активности глюкозооксидазы

Анализируемый раствор глюкозооксидазы или суспензию микрокапсул разбавляли до концентрации фермента 0,005 - 0,010 мг/мл. Смешивали 0,76 - 0,70 мл 0,1 М фосфатного буфера с рН 7,0, 0,40 - 0,60 мл разбавленного раствора глюкозооксидазы или суспензии микрокапсул с включенным ферментом, 0,30 мл раствора 0,015 - 0,010 мг/мл пероксидазы, 0,10 мл 8 мМ аминоантипирена в 0,11 М растворе фенола и 0,50 мл раствора 20 мг/мл D-глюкозы до достижения

общего объема реакционной смеси 1 мл [331]. Измеряли 2 мин поглощение при 492 нм. Активность фермента (Ед/мл) рассчитывали по следующим формуле:

$$A = \frac{\Delta A_{240} * 1000}{0,00658 * V_{al}} * P, \quad (2.8)$$

где A_{492} - прирост оптической плотности, о.е./мин; V_{al} - объем аликвоты раствора глюкозооксидазы в кювете, мкл; 0,00658 - молярный коэффициент экстинкции, $M^{-1}cm^{-1}$; P - разведение анализируемого раствора глюкозооксидазы.

2.4.3.8. Определение активности супероксиддисмутазы

Активности супероксиддисмутазы определяли по степени ингибирования реакции автоокисления пирогаллола [332]. За единицу активности принимали количество фермента, которое в течение 5 мин вызывает ингибирование реакции окисления пирогаллола на 50 % при 25° С. В ячейки планшета вносили по 20 мкл разбавленного раствора СОД, 160 мкл раствора 1,25 М диэтилентриаминпентауксусной кислоты в 0,05 М трис-буфере с рН 8,2 и 20 мкл раствора 0,5 мг/мл пирогаллола. Измеряли поглощение 5 мин при 420 нм.

2.5. Методы исследования

2.5.1. Изучение полиэлектролитных микрочастиц, полученных на нерастворимых матрицах белка

2.5.1.1. Турбидиметрическое титрование белка полианионом

Исследование проводили в растворе 0,15 М NaCl, рН 3,0. Для приготовления нПЭК к 50 мкл раствора инсулина с концентрацией 20 мг/мл добавляли 50 мкл раствора декстрансульфата с концентрациями 1,4, 2,0, 2,8, 3,3, 4,0 и 5,0 мг/мл. Смесь перемешивали 20 мин. После разбавления суспензии в 100 раз снимали спектры поглощения в диапазоне длин волн от 200 до 700 нм (рис. 2.6). Строили зависимость оптических плотностей при длине волны 320 и 400 нм от концентрации декстрансульфата.

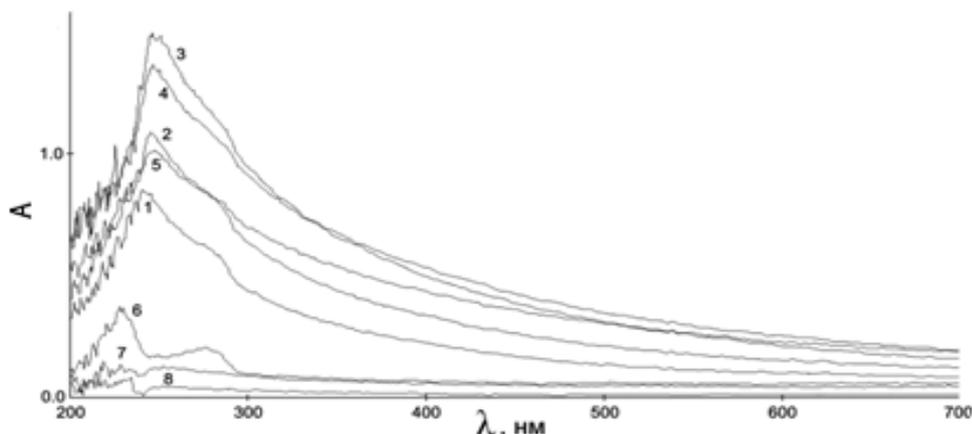


Рис. 2.6. Спектры поглощения дисперсий нПЭК (Инс-ДС), полученных при постоянной концентрации инсулина человека (0,1 мг/мл) и различных концентрациях декстрансульфата: 1 - 0,007, 2 - 0,01, 3 - 0,014, 4 - 0,0165, 5 - 0,020 мг/мл декстрансульфата; 6 - инсулин человека; 7 - декстрансульфат 0,025 мг/мл; 8 - 0,15 М NaCl.

2.5.1.2. Получение микрочастиц на матрицах высоленного химотрипсина с использованием синтетических полиэлектролитов

К 1 мл раствора 17,5 мг/мл химотрипсина в 0,5 мл 5 мМ HCl при перемешивании добавляли NaCl до конечной концентрации соли 5 М и выдерживали 20 мин. Осадок отделяли центрифугированием (5 мин, 200 g) и дважды промывали 1 мл 2,66 М NaCl в 5 мМ HCl. Далее частицы суспендировали в 1 мл 2,66 М NaCl и добавляли 0,5 мл раствора 10 мг/мл ПСС в 5 мМ HCl, содержащего 2,66 М NaCl. Суспензию инкубировали при перемешивании 20 мин. Осадок отделяли центрифугированием (5 мин, 500 g) и дважды промывали от не связавшегося полиэлектролита 1 мл раствора 2,66 М NaCl в 5 мМ HCl. ПАА наносили в тех же условиях в присутствии 0,5 М NaCl. Далее полиэлектролиты наносили попеременно в 0,5 М NaCl до достижения необходимого числа стадий сорбции (S). По окончании процесса микрочастицы промывали водой и ресуспендировали в 1 мл воды, лиофильно высушивали или хранили 5 мМ HCl при 4 °С.

2.5.1.3. Получение матриц с использованием высаливания

Для получения высоленных микроагрегатов инсулина (Инс) свиньи или человека к 0,5 мл раствора 20 мг/мл белка с рН 3,0 добавляли NaCl до концентрации 0,5 или 1 М соответственно. Смесь перемешивали 20 мин, осадок отделяли центрифугированием (2 мин, 200 g) и ресуспендировали в 0,5 мл раствора 0,5 М NaCl с рН 3,0. Для нанесения на высоленные микроагрегаты белка первого слоя полиэлектролита ((Инс)-ПА, S=1) прибавляли 0,5 мл раствора 5 мг/мл полианиона в 0,5 М NaCl с рН 3,0. Смесь перемешивали 20 мин, центрифугировали (2 мин, 200 g). Осадок дважды ресуспендировали в растворе 0,5 М NaCl, рН 3,0 и центрифугировали.

2.5.1.4. Получение микроматриц нерастворимого комплекса (Белок-Полианион)

Для получения нПЭК (Белок-ПА) смешивали по 0,5 мл растворов 20 мг/мл белка и 5 мг/мл полианиона. Процесс проводили в растворе 0,15 М с рН 3,0 - 4,0. Смесь перемешивали 20 мин и центрифугировали (2 мин, 200 g). Осадок микроагрегатов дважды суспендировали в растворе 0,15 М NaCl, рН 3,0 и центрифугировали.

2.5.1.5. Послойная адсорбция полиэлектролитов на микроматрицах белка

Послойную адсорбцию поликатионов и полианионов проводили в растворе 0,15 М NaCl с рН 3 и 4 на микроматрицах (Белок)-ПА или (Белок-ПА). К осадку микрочастиц прибавляли 1 мл раствора полиэлектролита с концентрацией 2,5 мг/мл и смесь перемешивали 10 мин. Осадок отделяли центрифугированием (2 - 3 мин, 300 g) и дважды промывали. По достижении необходимого числа стадий сорбции полиэлектролитов (S) микрочастицы суспендировали в растворе 0,15 М NaCl с рН 3,0 и хранили в таком виде или после двукратной промывки водой лиофильно высушивали. Образцы хранили при 4 °С.

2.5.1.6. Включение ингибиторов протеаз в микрочастицы

При включении ингибиторов на стадии образования нПЭК 20 мг/мл раствора инсулина смешивали с 20 мг/мл раствора ингибитора протеаз в 0,15 М NaCl, pH 3,0 до достижения нужного массового соотношения Инс : ИП. Полученный раствор белков смешивали с равным объемом 5 мг/мл раствора декстрансульфата. Смесь перемешивали 20 мин и центрифугировали (2 мин, 200 g). Осадок микроагрегатов дважды суспендировали в растворе 0,15 М NaCl, pH 3,0 и центрифугировали.

При включении апротинина на второй стадии сорбции к нПЭК (Инс-ДС) добавляли 1 мл 2,5 мг/мл раствора апротинина в 0,15 М NaCl, pH 3,0, смесь перемешивали 10 мин. Осадок отделяли центрифугированием (2 мин, 160 g) и дважды промывали в растворе 0,15 М NaCl, pH 3,0.

2.5.1.7. Высвобождение белка из микрочастиц

Для определения pH-зависимого высвобождения белка суспензию микрочастиц смешивали с универсальным буфером с pH 2 - 8 до конечной концентрации белка 0,20 - 0,25 мг/мл и инкубировали 1 ч (100 об/мин). Затем образцы центрифугировали (1 мин, 10000 g), в супернатантах анализировали концентрации белка, ингибиторов протеаз и декстрансульфата. Высвобождение оценивали по отношению концентраций компонента микрочастиц в супернатанте и в суспензии микрочастиц.

Для моделирования прохождения ЖКТ суспензию микрочастиц с концентрацией белка 0,20 - 0,25 мг/мл последовательно инкубировали при перемешивании (100 об/мин): 2 ч в растворе HCl с pH 1,1; 2 ч в 0,05 М фосфатном буфере с pH 6,0; 4 ч в 0,05 М фосфатном буфере с pH 7,4. При смене буфера суспензию центрифугировали (2 мин, 200 g), отделяли супернатант, а к осадку добавляли аналогичный супернатанту объем нового буферного раствора. В течение процесса инкубации отбирали аликвоты суспензии, которые центрифугировали (1 мин, 10000 g), а в супернатантах определяли концентрации белка и ингибиторов протеаз.

Для определения формы высвобождения белка из микрочастиц проводили хроматографию на колонке (1×13 см) с сефадексом G-50sf, G-75sf или G-100, предварительно откалиброванной по инсулинам, апротинину, ИББ, овальбумину и декстрансульфатам разных молекулярных масс. При подготовке образцов смешивали суспензию микрочастиц и 0,05 М фосфатный буфер, pH 7,4, до достижения концентрации белка 2 мг/мл, инкубировали 2 ч, центрифугировали и наносили на колонку 0,5 мл супернатанта. Хроматографию вели в 0,05 М Na-фосфатном буфере, pH 7,4, при скорости элюции 6 мл/ч. Во фракциях анализировали концентрации белка, ингибитора протеаз, и с учетом объема фракций относили эти показатели к суммарному значению во всех фракциях.

2.5.1.8. Анализ протеолитической дегградации инсулина

Белки растворяли, а микрочастицы суспендировали до конечной концентрацией белка 0,5 мг/мл и инкубировали при 37 °C (100 об/мин) в одной из искусственных сред, моделирующих

участки ЖКТ: 1 - 2 ч в растворе 2 мг/мл NaCl в 0,08 М HCl, содержащем 0,1 мг/мл (2,88 Ед/мл) пепсина и соответствующем соку желудка [333], 1 - 2 ч в 0,05 М трис-буфере, pH 7,1, содержащем 0,080 мг/мл трипсина (700 БАЭЭ Ед/мл) и 0,1 мг/мл химотрипсина (4 БТЭЭ Ед/мл), соответствующем соку поджелудочной железы [254], или 2 - 6 ч в 0,05 М трис-буфере, pH 7,8, содержащем 0,016 мг/мл трипсина (140 БАЭЭ Ед/мл), отвечающему соку просвета нижних отделов тонкого кишечника [334]. Протеолиз пепсина останавливали добавлением 5 М NaOH до pH 8,0, а трипсина и химотрипсина - добавлением трифторуксусной кислоты до концентрации 0,1 %. Далее смеси центрифугировали (5 мин, 10000 g), отбирали супернатант и анализировали пробы объемом 10 мкл на колонке "С 18" (4x250 мм) с детекцией поглощения при 210 нм по модифицированной методике [335]. Хроматографию вели при скорости элюента 1 мл/мин в смеси 0,1 % трифторуксусной в воде и 0,1 % трифторуксусной в ацетонитриле, соотношение компонентов изменяли в течение 5 мин в градиенте от 80/20 % до 50/50 %. Деградацию инсулина оценивали по отношению площадей пиков, соответствовавших интактному инсулину до и после воздействия протеаз.

2.5.1.9. Определение связывания микрочастицами ионов кальция

Определение проводили путем титрования с использованием эриохрома черного Т [268]. К 5 мг микрочастиц, суспендированных в 0,2 мл 0,15 М NaCl, pH 3,0, прибавляли 1 мл 0,01 М CaCl₂. Смесь инкубировали 30 мин (100 об/мин), центрифугировали (1 мин, 10000 g) и надосадочный раствор отделяли. Для анализа содержания Ca²⁺ смешивали 0,75 мл надосадочного раствора, 0,25 мл аммиачного буфера (5 г NH₄Cl, 25 мл концентрированного раствора аммиака, доведенные водой до 250 мл) и 0,05 мл раствора 50 мг/мл эриохрома черного Т в аммиачном буфере. Полученную смесь титровали 0,01 М ЭДТА и рассчитывали связывание Ca²⁺ микрочастицами.

2.5.1.10. Определение связывания микрочастицами муцина

К 2 мг микрочастиц прибавляли 1,6 мл водного раствора муцина с концентрацией 0,125, 0,25, 0,375 или 0,5 мг/мл. Суспензии инкубировали 1 ч при 37 °С (100 об/мин). Надосадочный раствор отделяли центрифугированием (5 мин, 1500 g) и анализировали содержание муцина. Адсорбцию муцина рассчитывали по разнице между добавленным и оставшимся в супернатанте количеством гликопротеина.

2.5.2. Изучение полиэлектролитных микрокапсул, сформированных на меламинаформальдегидных микросферах

2.5.2.1. Получение микрокапсул с использованием декстрансульфата и протамина

К 1 мл 20 % суспензии МФ-микросфер добавляли 5 мл раствора 5 мг/мл декстрансульфата 500 кДа в 0,2 М NaCl, pH 5,0. Суспензию инкубировали 5 мин на ультразвуковой бане и 5 мин при интенсивном перемешивании, центрифугировали (3 мин, 1000 g), отделяли надосадок, а осадок дважды промывали 6 мл раствора 0,2 М NaCl, pH 5,0. Далее прибавляли раствор 5 мг/мл протамина

(Пр) в 0,2 М NaCl, pH 5,0. Наносили восемь слоев (ДС-Пр)₄, затем частицы дважды промывали раствором 0,2 М NaCl, дважды водой и ресуспендировали в 1 мл воды. Для растворения МФ-микрофер к суспензии микрочастиц добавляли 10 мл раствора HCl, с pH 1,7, затем при перемешивании дробно добавляли 0,1 М HCl до достижения pH 1,7. Осадок центрифугировали (1 мин, 1000 g) и трижды промывали раствором 0,001 М HCl. Объем суспензии довели до 5 мл раствором 1 мМ HCl. Суспензию полученных микрокапсул, обозначенных МФ(ДС/Пр)₄, с концентрацией $(7 \pm 3) \cdot 10^7$ частиц/мл хранили при 5 °С.

Для исследования внутренней структуры микрокапсул МФ(ДС-Пр)₄ 50 мкл суспензии в универсальном буфере (pH 4 - 8) инкубировали 5 мин с 5 мкл раствора 6-карбоксихлорофлуоресцеина, родамина 6G или белка (1 мг/мл), меченного флуоресцентными красителями, затем центрифугировали и частицы трижды отмывали аналогичным буфером. При работе с ФИТЦ инкубировали 2 ч 50 мкл суспензии микрокапсул с 100 мкл 0,5 мг/мл раствора красителя и 850 мкл 50 мМ боратного буфера, pH 9,0, содержащего 150 мМ NaCl, а затем частицы трижды промывали буфером и водой.

2.5.2.2. Анализ взаимодействия белков с матриксными микрокапсулами

Смешивали 0,50 мл суспензии микрокапсул МФ(ДС-Пр)₄, 0,70 мл универсального буфера и 0,25 мл раствора 8 мг/мл белка. При необходимости в состав буфера включали 1 - 2 М NaCl или 30 %-ный изопропанол. Смеси инкубировали 1 ч при температуре 20 или 50 °С и центрифугировали (4 мин, 1000 g). Супернатанты отделяли, а микрокапсулы трижды промывали универсальным буферным раствором с соответствующим значением pH и ресуспендировали в 1 мл этого буфера. Концентрацию белка по методу Лоури измеряли в исходном растворе, супернатантах, промывных растворах и суспензиях микрокапсул.

Количество молекул белка в единичной микрокапсуле (L) рассчитывали по формуле:

$$L = \frac{c * N_A}{M_w * N}, \quad (2.9)$$

где c - концентрация белка в суспензии микрокапсул, мг/мл, N_A - число Авогадро, N - концентрация микрокапсул в суспензии, частиц/мл, M_w - молекулярная масса белка, г/моль.

Концентрацию белка в микрокапсуле (C_k) определяли по формуле:

$$C_k = \frac{3L * M_w}{4N_A * \pi * r^3}, \quad (2.10)$$

где r - радиус микрокапсулы, м.

Для высвобождения белка суспензию микрокапсул ресуспендировали в универсальном буфере до получения конечной концентрации $3,5 \cdot 10^6$ частиц/мл и инкубировали при 20 °С и перемешивании при 40 g. Через 10, 30 мин, 1, 3 и 7 ч отбирали аликвоты суспензии, центрифугировали (4 мин, 5000 g) и в супернатантах определяли содержание белка.

2.5.2.3. Включение биферментных систем в матриксные микрокапсулы

В микрокапсулы включали две системы глюкозооксидаза-пероксидаза и глюкозооксидаза-каталаза. Смешивали 0,20 мл суспензии микрокапсул, 0,55 мл универсального буфера с рН 7,0 или рН 8,0 и 0,25 мл раствора 0,25 мг/мл пероксидазы или 0,84 мг/мл каталазы. Смесь инкубировали 1 ч, микрокапсулы трижды промывали тем же буферным раствором, добавляли 0,75 мл универсального буферного раствора с соответствующим рН и 0,25 мл раствора глюкозооксидазы с концентрацией 2,0 или 0,64 мг/мл соответственно. Через 1 ч микрокапсулы трижды промывали буферным раствором. Аналогичные процедуры проводили и при включении в микрокапсулы отдельных ферментов. Измеряли концентрацию белка и активность ферментов в исходных и промывочных растворах, суспензиях микрокапсул. Микрокапсулы с включенными ферментами ресуспендировали в 1 мл раствора универсального буфера с рН 7,0 и хранили при 5 °С.

2.5.2.4. Визуализация активных ферментов в микрокапсулах

0,01 мл суспензии микросфер, с включенными глюкозооксидазой и пероксидазой, смешивали с 0,08 мл 0,25 М фосфатного буфера с рН 7,4, 0,05 мл $10 \cdot 10^{-3}$ М реагента Amplex Red в диметилсульфоксиде и 0,05 мл 20 мг/мл D-глюкозы. Образование резорурфина контролировали с помощью КЛСМ по флуоресценции при 587 нм.

2.5.2.5. Определение концентрации глюкозы с использованием биферментных систем

Измерение концентрации глюкозы с использованием глюкозооксидазы - каталазы проводили по методике [336]. Смешивали 0,83 - 0,84 мл 0,1 М аммоний фосфатного буфера с рН 7,0, 0,01 мл суспензии микрокапсул с включенной биферментной системой или 0,01 мл раствора глюкозооксидазы и 0,01 мл раствора каталазы с концентрациями, аналогичными суспензии микрокапсул, 0,10 мл раствора 0,18 М ацетилацетона в 15 М метаноле и 0,05 мл раствора 1 - 12 мг/мл D-глюкозы до достижения общего объема реакционной смеси 1,00 мл. Смеси инкубировали 1 ч и измеряли поглощение при 410 нм.

Для измерения концентрации глюкозы с использованием глюкозооксидазы - пероксидазы смешивали 0,96 мл 0,1 М ацетатного буфера с рН 5,0, 0,010 мл суспензии микрокапсул с включенными ферментами ($1,4 \cdot 10^5$ частиц), раствор 8 мг/мл АБТС и 0,010 мл D-глюкозы с концентрацией 2 - 40 мг/мл. В течение 2 - 3 мин измеряли поглощение при 403 нм.

2.5.3. Изучение микрочастиц, сформированных на основе ватерита

2.5.3.1. Общая методика получения микросфер ватерита

В стакан с диаметром дна 48 мм и магнитным мешальником (35 x 7 мм) добавляли последовательно 3 мл раствора 1 М CaCl_2 , 9 мл воды или 0,1 М трис-буфера и 10 мин перемешивали 100 - 300 об/мин. Далее быстро добавляли 3 мл раствора 1 М Na_2CO_3 , 45 сек перемешивали, а затем выдерживали суспензию 15 мин без перемешивания и далее центрифугировали (1 мин, 1000 g). Осадок микросфер ватерита (далее микросферы обозначены

СС) трижды промывали водой и высушивали лиофильно. Количество частиц в 1 мг препарата СС составляло $9 \cdot 10^6$.

2.5.3.2. Получение микросфер ватерита с сосажденными белками, муцином и доксорубицином

В стакан добавляли последовательно 3 мл 1 М раствора CaCl_2 , 9 мл раствора белка или доксорубицина и/или муцина в необходимом буфере (0,05 М глициновый, pH 8,0-10,0, или 0,05-0,1 М трис-буфер, pH 7-8) до достижения требуемой концентрации в реакционной среде (от 0,1 до 5 мг/мл). Далее все операции проводили согласно, описанной общей методике (2.5.3.1), и получали препараты, представленные в табл. 2.1.

Полученные осадки микросфер ватерита замораживали при -70°C и высушивали лиофильно, а далее хранили при 5°C . Количество частиц в 1 мг препарата с сосажденным муцином (ССМ) составляло $8 \cdot 10^6$. Анализировали концентрацию БАВ в надосадочном и промывочных растворах, а также активность ферментов в суспензии микросфер или после растворения CaCO_3 с использованием ЭДТА.

2.5.3.3. Получение микросфер ватерита с адсорбированными белками и муцином

1,5 мл раствора белка, муцина или доксорубицина (0,1 - 5,0 мг/мл) в необходимом буфере (0,05 М глициновый буфер, pH 8,0-10,0, или 0,05 М трис-буфер, pH 7 - 8) добавляли к 20 - 60 мг сухих микросфер ватерита. Инкубировали суспензию 10 - 180 мин при перемешивании, центрифугировали (5 мин, 2000 - 10000 g) и промывали соответствующим буфером. Анализировали концентрацию БАВ в надосадочном и промывочных растворах, а также активность ферментов в суспензии микросфер или после растворения CaCO_3 с использованием ЭДТА.

Значения равновесной адсорбции БАВ (q_e , мг/г) определяли по формуле:

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e) \times V}{m} \quad (2.11)$$

где C_0 и C_e – исходная и равновесная концентрации БАВ (мг/мл); V - объем (мл) раствора белка; m - масса микрочастиц CaCO_3 (мг).

Эффективность включения белка (%) при адсорбции и сосаждении была рассчитана с использованием уравнения:

$$\eta = \frac{C_0 - C_e}{C_0} \times 100. \quad (2.12)$$

2.5.3.4. Расчет констант адсорбционного равновесия белков

Для определения констант адсорбционного равновесия на микросферах ватерита была использована модель изотермы адсорбции Ленгмюра:

$$q_e = \frac{q_m K_a C_e}{1 + K_a C_e} \quad (2.13)$$

где q_e - равновесная адсорбция, мг/г; C_e - концентрация белка при достижении адсорбционного равновесия, мг/мл; q_m - максимальное значение адсорбции для формирования монослоя, мг/г; K_a - константа адсорбционного равновесия по Ленгмюру, г/мг.

Экспериментальные изотермы адсорбции БАВ были спрямлены в координатах: 1) $1/q_e = f(1/C_e)$, 2) $q_e = f(q_e/C_e)$, 3) $C/q_e = f(C_e)$ и определены значения q_m и K_a , описывающие уравнение адсорбции Ленгмюра. Для каждой модели рассчитан коэффициент детерминации r^2 , оценивающий отклонения экспериментальных данных от модельных значений адсорбции. По результатам сравнения r^2 были выбраны для каждого БАВ значения q_m и K_a наиболее точно описывающие экспериментальные данные по уравнению Ленгмюра.

При использовании моделей Фрейндлиха и БЭТ для расчета адсорбционных констант проводили математическую обработку данных.

3.5.3.5. Методика получения полиэлектrolитных капсул с белками с использованием микросфер ватерита

Получение полиэлектrolитных микрокапсул проводили путем послойной адсорбции декстрансульфата 500 кДа или муцина из желудка свиньи и протамина в растворе 0,15 М NaCl с рН 8 - 9. К осадку 100 мг микросфер ватерита СС, микросфер ватерита с сосажденными или микросфер ватерита с адсорбированными белками или муцином прибавляли 7 мл 1 мг/мл раствора полиэлектrolита, перемешивали 10 мин и центрифугировали (30 сек, 500 g). Осадок суспендировали в растворе 0,15 М NaCl без полиэлектrolита и центрифугировали в тех же условиях. Процесс повторяли до достижения необходимого числа стадий сорбции полиэлектrolитов S, а далее надосадочный раствор отделяли, а осадок переносили в стеклянные колбы с плоским дном. К суспензии микросфер ватерита, покрытых полиэлектrolитной оболочкой, в течение 30 мин дробно прибавляли по 1 мл 12 - 15 мл 0,2 М раствора ЭДТА. После полного растворения CaCO₃ мультислойные микрокапсулы дважды промывали водой и доводили суспензию до объема 5 мл. Для анализа содержания сухого вещества в микрочастицах аликвоты суспензий высушивали и взвешивали. Перед анализом содержания белка суспензию полиэлектrolитных микрокапсул смешивали в соотношении 1 : 1 с раствором NaOH с рН 12,0 для разрушения комплекса декстрансульфата и протамина.

При включении белков в готовые полиэлектrolитные капсулы, сформированные на микросферах ватерита, к 0,5 мл суспензии частиц прибавляли 0,5 мл раствора 1 мг/мл белка в 0,05 М трис-буфере с рН 7,4. Суспензию инкубировали 30 мин, центрифугировали (5 мин, 10000 g), осадок промывали буфером с соответствующим рН.

3.5.3.6. Высвобождение белков, муцина и доксорубина из микросфер ватерита

Высвобождение оценивали по отношению количества БАВ, высвободившегося при инкубации микросфер в раствор, к количеству БАВ, включившегося в микросферы.

При изучении кинетики к осадку микросфер ватерита добавляли 1,5 мл раствора 0,05 М трис-буфера с рН 7,4. Инкубировали при 25 °С и перемешивании 250 об/мин, через 0,5, 1, 2, 3 и 72 ч отбирали пробы, центрифугировали (2 мин, 2000 g) и измеряли в надосадочных растворах концентрацию БАВ. За морфологией микросфер в процессе инкубации следили с помощью световой микроскопии, СЭМ и РФА.

При изучении рН-зависимого высвобождения к осадку микросфер ватерита добавляли 1,5 мл раствора универсального буфера с рН 4 - 8. Пробы инкубировали 1 ч при 25 °С и перемешивании 550 об/мин. Отбирали половину суспензии, центрифугировали (2 мин, 2000 об/мин), удаляли надосадочный раствор. Активность ферментов измеряли в суспензии и надосадочном растворе. Концентрацию белка в надосадочном растворе оценивали спектрофотометрически при 280 нм и с помощью аналитической гель-хроматографии (2.4.2).

2.5.3.7. Изучение стабильности ферментов, иммобилизованных на микросферах ватерита

При анализе активность фермента после воздействия инактивирующих факторов относили к активности фермента до начала их воздействия.

Для изучения термоинактивации контрольный раствор фермента 0,002-0,01 мг/мл или суспензию микросфер ватерита с сорбированным ферментом с концентрацией частиц 0,8 - 4 мг/мл в 0,05 М трис-буфере с рН 7,0 инкубировали 10 мин (25 - 60 °С, 200 об/мин).

Для изучения инактивации фермента под действием органического растворителя к контрольному раствору фермента с концентрацией 0,01 - 0,1 мг/мл или суспензии микросфер с концентрацией частиц 4 - 40 мг/мл в 0,05 М трис-буфере с рН 7 прибавляли ацетонитрил до достижения концентрации от 0 до 50 об. % и инкубировали 10 мин (25 °С, 200 об/мин).

Для изучения протеолиза каталазы к 1 мл раствора фермента с концентрацией 0,01 мг/мл или суспензии микросфер с концентрацией частиц 4 мг/мл в 0,05М трис-буфере с рН 7,0 добавляли 24 мкл раствора 1 мг/мл трипсина и инкубировали 0,5 - 3 ч.

2.5.4. Изучение действия препаратов *in vitro* и *in vivo*

2.5.4.1. Взаимодействие частиц ватерита с белками и клетками крови

2.5.4.1.1. Выделение клеток крови

Эксперименты с кровью проводили в ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА. Выделение лейкоцитов (моноклеарных и полиморфноядерных) и эритроцитов проводили путем центрифугирования на двойном градиенте плотности фиколл-верографин 1,077/1,119 г/л. В пробирки объемом 15 мл последовательно наслаивали: 3 мл смеси Histopaque с плотностью 1,119 г/л, 2 мл Histopaque с плотностью 1,077 г/л и 3 мл крови. Пробирки центрифугировали (50 - 60 мин, 1500 g) и отбирали последовательно плазму, моноклеарные лейкоциты (моноциты и лимфоциты) и полиморфноядерные лейкоциты до осадка эритроцитов. Все клетки дважды

промывали десятикратным избытком среды Кребса-Рингера, а эритроциты дополнительно промывали 0,15 М NaCl. По результатам подсчета клеток в камере Горяева суспензии эритроцитов содержали $(5 - 10) \cdot 10^9$ клеток/мл.

2.5.4.1.2. Обработка микросфер ватерита альбумином и плазмой крови

К 1 мл суспензий 20 мг/мл микросфер ватерита в 0,15 М NaCl добавляли 1 мл раствора 30 мг/мл альбумина или плазмы крови, разбавленной в 2 раза. Инкубировали суспензии 30 мин при 37 °С, центрифугировали (2 мин, 2000 об/мин), надосадок удаляли. Осадки дважды промывали десятикратным объемом раствора 0,15 М NaCl или дистиллированной воды для измерения ξ -потенциала частиц.

2.5.4.1.3. Оценка лизиса эритроцитов

К 40 мкл суспензии микросфер ватерита с концентрацией от 1 - 10 мг/мл добавляли 40 мкл суспензии эритроцитов, содержащей $(5 - 10) \cdot 10^9$ клеток/мл, и доводили объем до 240 мкл раствором 0,15 М NaCl. Образцы инкубировали 20 - 120 мин при 37 °С и центрифугировали (10 мин, 1000 об/мин), отбирали по 100 мкл надосадочного раствора в лунки планшета, куда предварительно было внесено 100 мкл раствора 0,15 М NaCl. Измеряли поглощение при длине волны 540 нм и рассчитывали концентрацию высвободившегося гемоглобина. В качестве контролей (без добавления частиц ватерита) использовали суспензию эритроцитов в 0,15 М NaCl (отсутствие лизиса эритроцитов) и суспензию эритроцитов в воде (лизис эритроцитов 100 %).

2.5.4.1.4. Оценка хемилюминесценции нейтрофилов

В кювету хемилюминометра Lum1200 («ДИсофт», Россия) вносили 415 мкл среды Кребса-Рингера, 15 мкл 10 мМ люминола или люцигенина и 25 мкл суспензии нейтрофилов. Конечная концентрация нейтрофилов в кювете составляла $2,5 \cdot 10^5$ клеток/мл. Измеряли уровень спонтанной хемилюминесценции (ХЛ), а затем вносили по 50 мкл суспензии 1 - 10 мг/мл микросфер ватерита и продолжали регистрировать ХЛ сигнал. Величину активации оценивали по разнице следующих величин: $\Delta\text{ХЛ} = \text{ХЛ}_{\text{макс}}$ (максимальный уровень ХЛ, зарегистрированный в кювете) – $\text{ХЛ}_{\text{сп}}$ (уровень спонтанной ХЛ перед добавлением частиц). В отдельных экспериментах вместо суспензии микросфер вносили надосадочный раствор, полученный после их инкубации в растворе 0,15 М NaCl, или раствор CaCl₂. В ряде экспериментов после достижения максимума ХЛ под действием микросфер ватерита в пробы вносили второй активатор форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА) до конечной концентрации в пробе 100 нг/мл и продолжали измерения.

Для оценки влияния супероксиддисмутазы или каталазы растворы ферментов добавляли в кювету люминометра при достижении максимальных значений ХЛ ответа в пробе.

При анализе эффектов гипохлорита натрия суспензию 10 мг/мл гибридных микросфер ватерита с муцином ССМ в 0,15 М NaCl смешивали с равным объемом водного раствора NaOCl

до конечной концентрации 0,1 - 10 мМ, инкубировали 30 мин при 37 °С, центрифугировали, трижды промывали 0,15 М NaCl и ресуспендировали до концентрации частиц 10 мг/мл.

2.5.4.2. Изучение действия микрокапсулированного инсулина на лабораторных животных

Протоколы экспериментальных исследований на животных были утверждены этическим комитетом Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова, в виварии которого проводились эксперименты. Животные содержались на стандартной диете при температуре 22±2 °С и 12-часовом световом цикле.

2.5.4.2.1. Определение содержания глюкозы в плазме крови

Отобранные образцы крови животных центрифугировали (10 мин, 3000 об/мин) для отделения форменных элементов крови. Определение содержания глюкозы проводили в плазме крови глюкозооксидазным методом с использованием диагностического набора «Глюкоза-Агат».

2.5.4.2.2. Определение содержания инсулина в плазме крови

Измерение проводили с помощью иммуноферментного набора для определения инсулина человека «Insulin ELISA Monobind». В лунки планшета, покрытые стрептавидином, вносили по 50 мкл стандартов инсулина из набора (0, 5, 25, 50, 100 и 300 мкМЕ) и образцов плазмы, добавляли по 0,1 мл ферментного реагента и перемешивали 20 - 30 сек. После 2 ч инкубации из лунок удаляли жидкость, трижды промывали 300 мкл промывочного буфера, вносили по 0,1 мл рабочего раствора субстрата и инкубировали 15 мин. Развитие окраски останавливали добавлением 50 мкл 1 М HCl. Поглощение измеряли на микропланшетном ридере при длине волны 450 нм. По оптическим плотностям стандартных растворов строили калибровочную кривую, по которой определяли содержание инсулина человека в анализируемых образцах.

2.5.4.2.3. Изучение на здоровых кроликах

Исследование биологической активности проводили на здоровых кроликах шиншилла, самцах, весом 2,5 - 3,5 кг. В процессе эксперимента животные имели свободный доступ к питьевой воде. За 3 ч до начала и в процессе эксперимента животные не имели доступа к еде. Подкожное введение препаратов инсулина осуществляли в объеме 1 мл в дозе 4 МЕ/кг массы животного. Перорально суспензию микрочастиц вводили в объеме 3 мл в дозе 4 МЕ/кг массы животного по корню языка. Далее для более полного попадания препарата в пищевод дополнительно вводили 5 мл дистиллированной воды. Контрольным животным вместо инсулина аналогично вводили раствор 0,15 М NaCl, pH 3,0. Каждая группа насчитывала 5 - 6 животных. Взятие крови проводили из краевой вены уха кролика. Уровень глюкозы в крови анализировали на приборе OneTouchII с использованием тест-полосок OneTouch. Процентное снижение концентрации глюкозы в крови определяли по формуле:

$$X = \frac{a-b}{a} \times 100 \%, \quad (2.14)$$

где а - исходная концентрация глюкозы в крови; b - средняя концентрация глюкозы в крови из двух определений, проведенных через 1 и 2,5 ч после введения инсулина.

Сохранение биологической активности определяли, как отношение снижения уровня глюкозы в крови животных после введения испытуемых препаратов к снижению, вызываемому инсулином в растворе.

2.5.4.2.4. Изучение на крысах с индуцированным диабетом

Исследование проводили на самцах крыс Вистар, весом 250 - 350 г. Диабет вызывали внутрибрюшинным введением стрептозотоцина в дозе 50 мг/кг веса животного (раствор 26,6 мг/мл в 0,1 М цитратном буфере, рН 4,5). Для подтверждения развития у крыс устойчивого диабета через 7 и 14 суток после введения стрептозотоцина определяли содержание глюкозы в крови животных натощак (после 12 ч голодания). В эксперимент отбирали животных, у которых в обоих случаях уровень глюкозы в крови был не менее 13 мМ.

При изучении гипогликемического действия натощак животные были разделены на четыре группы ($n \geq 5$): контрольную, которой вводили перорально раствор 0,15 М NaCl с рН 3,0; опытную 25 МЕ/кг, которой вводили перорально препарат микрокапсулированного инсулина в дозе 25 МЕ/кг; опытную 10 МЕ/кг, которой вводили перорально препарат микрокапсулированного инсулина в дозе 10 МЕ/кг; сравнения, которой вводили подкожно инсулин в дозе 4 МЕ/кг. Пероральное введение препарата производили по корню языка в объеме 0,5 мл в 0,15 М NaCl, рН 3,0. При подкожном введении осуществляли инъекцию инсулина в объеме 0,5 мл в 0,15 М NaCl, рН 3,0. За 12 ч до начала эксперимента у животных отбирали корм. В процессе эксперимента животные не имели доступа к еде и имели свободный доступ к питьевой воде. Перед началом эксперимента и через 1, 2, 4, 6, 9, 12, 15, 18, 21 и 24 ч после введения препарата инсулина проводили взятие крови из хвостовой вены крыс. Образцы центрифугировали 10 мин при 5000 об/мин и определяли содержание глюкозы в плазме крови. Строили кривую изменения во времени концентрации глюкозы в крови животных.

Биодоступность перорально введенного микрокапсулированного инсулина определяли, сравнивая снижение глюкозы по сравнению с инъекционным введением. Площадь над кривой изменения уровня глюкозы перорально вводимого препарата относили к аналогичной величине инъекционно вводимого инсулина с поправкой на различия во введенных дозах [337] по формуле:

$$\text{БД} = \left(\frac{\text{ПНКорал}}{\text{ПНКподк}} \right) \times \left(\frac{\text{ДОЗАорал}}{\text{ДОЗАподк}} \right) \times 100 \%, \quad (2.15)$$

где ПНК_{ОРАЛ} - площадь над кривой при пероральном введении, мМ·ч; ПНК_{ПОДК} - площадь над кривой при подкожном введении, мМ·ч; ДОЗА_{ОРАЛ} – введенная доза при пероральном введении, МЕ/кг; ДОЗА_{ПОДК} – введенная доза при подкожном введении, МЕ/кг.

При проведении хронического эксперимента животные имели свободный доступ к еде и воде (ad libitum). Животные были разбиты на две группы: контрольную (n=6), которой дважды в

сутки в 10 и 16 ч вводили перорально раствор 0,15 М NaCl с рН 3,0; опытную (n=6), которой дважды в сутки в 10 и 16 ч вводили перорально препарат микрокапсулированного инсулина в 0,15 М NaCl, рН 3,0. Разовая вводимая доза микрокапсулированного инсулина для опытной группы составляла 25 МЕ/кг в течение первых 4 суток, 50 МЕ/кг на 5 сутки, 100 МЕ/ кг с 6 по 9 сутки. На 10 сутки животным вводили препарат совместно микрокапсулированных инсулина 100 МЕ/кг и ингибитора Баумана-Бирк. Уровень глюкозы оценивали в крови, взятой из хвостовой вены крыс, на приборе OneTouchII с использованием тест-полосок OneTouch. Точка «0 ч» соответствовала утреннему измерению глюкозы непосредственно перед первым суточным приемом препарата. Точка «1 ч» соответствовала измерению через 1 ч после первого приема препарата. Точка «6 ч» непосредственно предшествовала второму введению препарата. Для анализа инсулина отдельно отбирали по 100 мкл крови в пробирки с гепарином и центрифугировали (20 мин, 400 g), супернатант отделяли и хранили в замороженном виде.

2.5.5. Расчёт результатов, достоверность и статистический анализ

Все данные получены как минимум в трёх повторах в рамках одного эксперимента и на трёх разных препаратах. Представленные рисунки отражали типичные результаты экспериментов с повторяемостью как минимум для трёх препаратов. Данные в графиках и диаграммах представлены как среднее \pm стандартное отклонение. При сопоставлении групп животных использовался непараметрический метод (U-критерий Манна-Уитни, T-критерий Вилкоксона). Статистически значимым считали различие при $p < 0,05$.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Микрокапсулирование послойной адсорбцией полиэлектролитов на нерастворимых матрицах, содержащих белок

Раздел посвящен разработке способа микрокапсулирования на новых наноструктурированных микроматрицах (рис. 3.1), полученных высаливанием белка (Белок) с последующей адсорбцией полианиона (Белок)-ПА или образованием нерастворимого полиэлектролитного комплекса белка (нПЭК) с полианионом (Белок-ПА), путем послойной адсорбции полиэлектролитов и последующего измельчения с помощью воздействия ультразвука (УЗ), а также исследованию физико-химических и биологических свойств мультислойных микрочастиц и возможности их использования в качестве средств доставки белка.

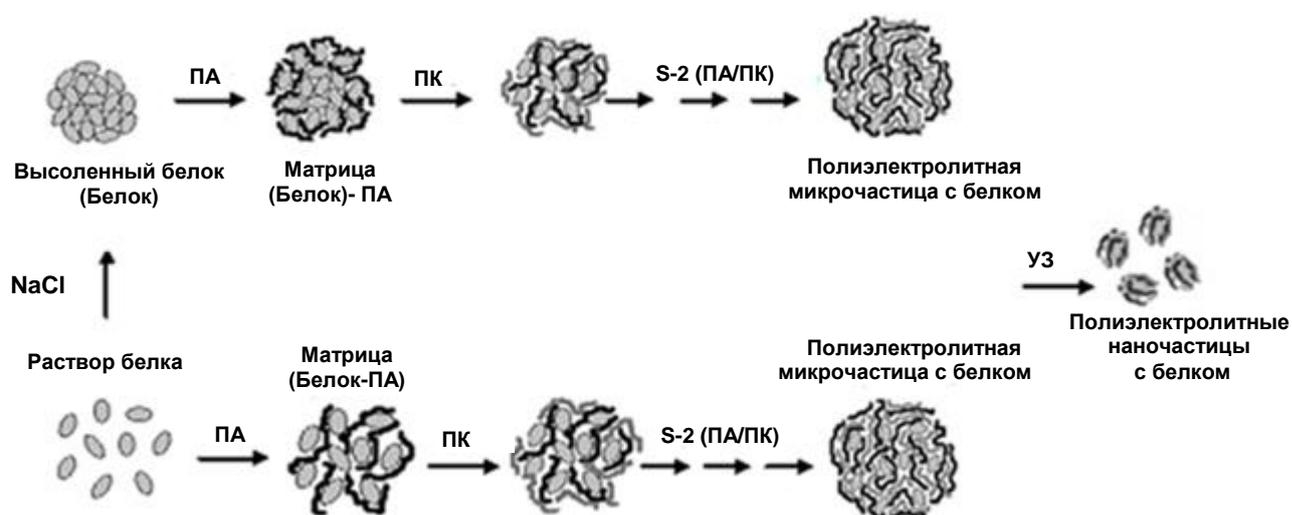


Рис. 3.1. Схема получения частиц послойной адсорбцией полиэлектролитов на матрицах в виде высоленных агрегатов белка с последующей адсорбцией полианиона или нерастворимого полиэлектролитного комплекса белка с полианионом и измельчения ультразвуком (ПК - поликатион; ПА - полианион, S - количество стадий сорбции полиэлектролитов, УЗ - ультразвук).

3.1.1. Модельное микрокапсулирование на высоленных микроагрегатах химотрипсина с использованием синтетических полиэлектролитов

Основные закономерности процесса были установлены с использованием высоленных в 2,66 М NaCl, 0,05 М HCl микроагрегатов химотрипсина, представляющих собой неоднородные по форме частицы с преимущественным распределением по размерам от 1 до 10 мкм (рис. 3.2). Использование высокой концентрации соли позволило провести послойную адсорбцию только пары синтетических полиэлектролитов - полианиона поли (стиролсульфонат) натрия 70 кДа (ПСС) и поликатиона поли (аллиламин гидрохлорида) 50 кДа (ПАА), полиэлектролитный комплекс которых стабилен в широком диапазоне pH и концентрации солей. В связи с проведением высаливания в кислой среде и наличием в этих условиях у химотрипсина положительного заряда

для первой стадии адсорбции был использован ПСС, а полученные микроматрицы обозначены как (Хим)-ПСС с числом стадий сорбции полиэлектролитов равным 1 ($S=1$).

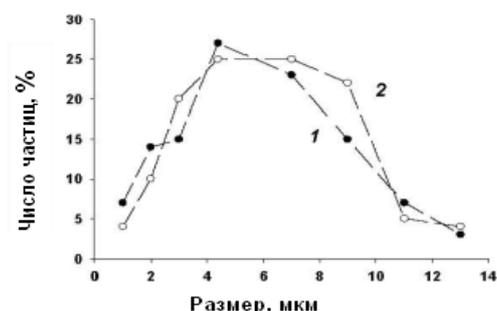


Рис. 3.2. Распределение по размерам высоленных микроагрегатов химотрипсина (1) и полученных на их основе микрочастиц с 11 стадиями адсорбцией ПСС и ПАА.

Процесс нанесения полианиона осуществляли в растворе 2,66 М NaCl для предотвращения растворения (Хим)-ПСС. Последующую послойную адсорбцию до достижения необходимого числа стадий сорбции полиэлектролитов (S) проводили при более низкой ионной силе 0,5 М NaCl. В этих условиях происходило образование устойчивого комплекса между ПСС и ПАА. С увеличением числа стадий сорбции полиэлектролитов уменьшались эффективность включения белка и содержание белка в микрочастицах (табл. 3.1). Потери белка при нанесении первых слоев полиэлектролитов и промывках были большие, а далее незначительно уменьшались с увеличением числа стадии адсорбции полимеров (табл. 3.1).

Таблица 3.1. Свойства полиэлектролитных микрочастиц, полученных на высоленных микроагрегатах химотрипсина с использованием послойной адсорбции ПСС и ПАА

Число стадий адсорбции (S)	Эффективность включения белка, %	Содержание белка в препарате, %	Высвобождение белка в 1 мМ HCl через 7 суток, %
1	53±6	80±9	12±4
3	44±5	65±9	2,0±2,0
5	45±6	67±6	1,0±0.1
11	42±3	51±5	0±0

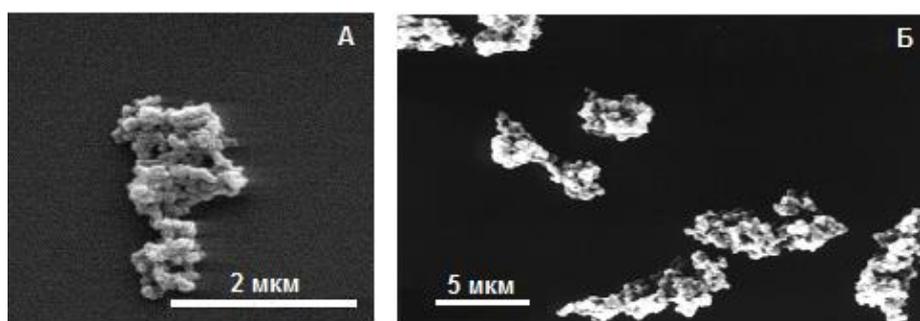


Рис. 3.3. СЭМ фотографии микроагрегатов химотрипсина, полученных на микроматрицах (Хим)-ПСС с 3 (А) и 11 (Б) стадиями адсорбции ПСС и ПАА.

По данным СЭМ (рис. 3.3) микрочастицы, независимо от числа стадий сорбции, представляли собой замкнутые образования неправильной формы, которая соответствовала форме исходных высолённых агрегатов белка. Микрочастицы были наноструктурированными, включая первичные образования размером 100 - 200 нм.

Микрочастицы с числом стадий адсорбции полиэлектролитов $S \geq 3$ были стабильны в растворе 1 мМ HCl (табл. 3.1) и не выделяли иммобилизованный белок. Высвобождение белка из микрочастиц наблюдалось только при увеличении pH среды (рис. 3.4).

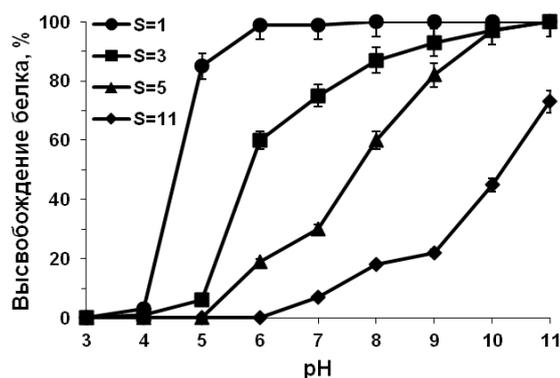


Рис. 3.4. Влияние pH среды и числа стадий адсорбции ПСС и ПАА на высвобождение белка из микрочастиц, полученных на матрицах (Хим)-ПСС. Условия: универсальный буфер, 1 ч.

В интервале pH 3 - 11 микрочастицы продолжали существовать в связи с нерастворимостью комплекса ПСС-ПАА. Ослабление ионных взаимодействий в стехиометрическом комплексе ПСС-ПАА наблюдалось только в интервале pH 10 - 11, а его разрушение - при pH 11,5 (рис. 3.5).

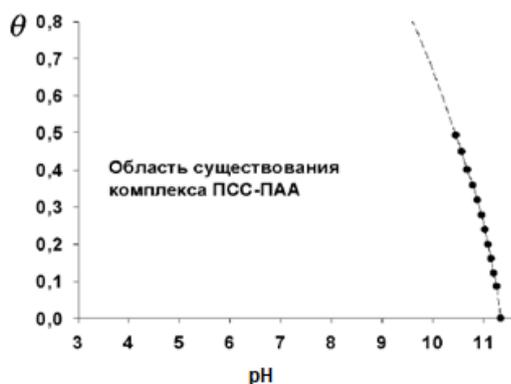


Рис. 3.5. pH-зависимость доли межмолекулярных ионных связей в комплексе (ПСС-ПАА) от их максимального числа θ .

Высвобождение белка из микрочастиц было обусловлено изменением заряда химотрипсина (pI 8,5), что приводило к ослаблению его взаимодействия с заряженными группами полиэлектролитов. С увеличением числа стадий сорбции профиль высвобождения белка смещался в щелочную область (рис. 3.4). Скорость высвобождения белка (рис. 3.6) уменьшалась с увеличением числа стадий сорбции, что обусловлено дополнительным связыванием белка с полимерами и стабилизацией сетки из полиэлектролитных слоев.

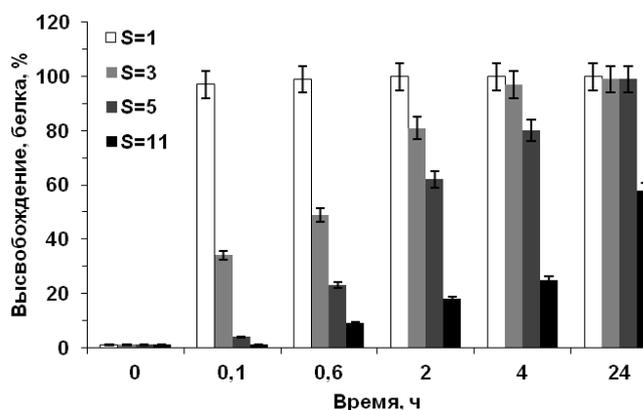


Рис. 3.6. Влияние числа стадий адсорбции ПСС и ПАА на кинетику высвобождения белка при рН 8,0 из микрочастиц, полученных послойной адсорбцией полиэлектролитов на матрицах (Хим)-ПСС. Условия: 50 мМ трис-буфер, рН 7,4.

Оба использованных полиэлектролита в растворе при массовом соотношении к ферменту до 50:1 не изменяли активность химотрипсина, а после растворения высоленных агрегатов (Хим) при рН 12 химотрипсин сохранял 86 ± 9 % активности нативного фермента. Активность иммобилизованного химотрипсина в микрочастицах, покрытых одним, пятью и одиннадцатью слоями полиэлектролитов, составляла 17 ± 3 , 5 ± 3 и 4 ± 1 % соответственно. Падение активности связано со стерическими затруднениями для диффузии субстрата к молекулам иммобилизованного фермента и его высокой локальной концентрацией в частицах, что приводило к конверсии субстрата лишь приповерхностными молекулами протеазы. Возможно также, что изменения в конформации высоленного белка фиксировались при образовании комплекса с ПСС на первой стадии сорбции и далее при послойном нанесении полиэлектролитов.

Дополнительно изучена проницаемость микрочастиц с $S=11$ для ингибиторов протеаз - фенилметилсульфонил фторида (174 Да) и апротинина (6,5 кДа, рI 10,5). Для низкомолекулярного синтетического ингибитора при мольном соотношении к ферменту 10:1 наблюдалась полная инактивация фермента в растворе и 69 % инактивации в микрочастицах. Для эквимольного количества белкового ингибитора апротинина происходило 85 % ингибирование химотрипсина в растворе и только 13 % ингибирования активности иммобилизованного фермента. Понижение ингибирования в микрочастицах могло быть обусловлено частичным связыванием ингибиторов полиэлектролитными слоями, но в целом свидетельствовало о проницаемости полиэлектролитных стенок для БАВ с молекулярной массой до 6,5 кДа.

Таким образом, при использовании матриц в виде высоленных агрегатов химотрипсина с адсорбированным полианионом первого слоя с использованием послойной адсорбции полиэлектролитов были получены микрочастицы, характеризующиеся высоким содержанием белка, перспективные для создания рН-чувствительных контейнеров для доставки БАВ. В дальнейшем микрокапсулирование проводили как на высоленных микроагрегатах, так и на нПЭК

белка, получение которых было возможно при физиологических концентрациях соли, что позволяло использовать биополиэлектролиты и их производные.

3.1.2. Микрокапсулирование с использованием биополиэлектролитов и их производных

3.1.2.1. Получение, характеристика и сравнение матриц, полученных с использованием высаливания и образования нерастворимого полиэлектролитного комплекса белка

Для получения микроматриц с высоким содержанием белка размером 3 - 10 мкм были использованы кислые белки - цинковые соли инсулина свиньи (Инс_{св}, 5807 Да, pI 5,5) и человека (Инс_{чел}, 5808 Да, pI 5,35), отличающиеся одной аминокислотной заменой в Б-цепи, и основной гликопротеин лактоферрин (ЛФ, 80 кДа, pI 11), а также три полианиона с различной плотностью заряда: декстрансульфат с молекулярной массой 5, 100, 500 кДа (ДС₅, ДС₁₀₀, ДС₅₀₀), полиамфолит хитозансульфат 150 кДа (ХС₁₅₀) [338] и альгинат средней вязкости (Алг).

Для формирования нПЭК инсулина с полианионом, далее обозначенных (Инс-ПА), характеризующихся высоким содержанием белка и отрицательным зарядом поверхности, было изучено влияние массового соотношения компонентов. Оптимальные условия образования нПЭК были подобраны при использовании декстрансульфата 500 кДа и инсулина человека, выбор соотношения которых проводили исходя из плотности зарядов на молекулах белка и полианиона и по данным турбидиметрического титрования. Наличие 2,3 сульфатных групп на один гликозидный остаток обеспечивало высокую плотность заряда декстрансульфата в широком диапазоне pH (157 Да на заряд). Для выяснения плотности положительного заряда молекулы инсулина была выбрана гексамерная единица (код доступа в банке данных PDB 1EVR), для которой был проведён расчёт кривой титрования заряда с помощью программы MacroDox и модифицированного метода Тэнфорда-Кирквуда [339]. Метод позволяет достаточно точно проводить расчёт кривых титрования для белковых молекул сферической формы, при условии, что титруемые остатки белка находятся на поверхности. Это требование хорошо выполнялось для гексамера инсулина, который может быть представлен в виде сферы радиусом 25 Å (рис. 3.7 А). Вычисленное значение изоэлектрической точки молекулы гормона при ионной силе 0,15 М, составило 5,4, что хорошо согласовывалось с экспериментально определённым значением этого параметра (pI 5,35). Теоретические расчёты показали, что гексамер инсулина при pH 3 представляет собой сферу радиусом 5,3 нм и зарядом +26.

На кривых турбидиметрического титрования инсулина декстрансульфатом (рис. 2.6, 3.8) наблюдали максимум, соответствующий массовому соотношению компонентов 6:1~7:1, при котором эквивалентная плотность положительного заряда молекулы белка составила 4 или 24 на гексамерную единицу, что хорошо согласовывалось с теоретическим расчётом. Исходя из этих

данных, в растворе 0,15 М NaCl были получены и охарактеризованы нПЭК при массовых соотношения Инс_{чел} : ДС₅₀₀ 7:1, 5:1, 4:1 (табл. 3.2).

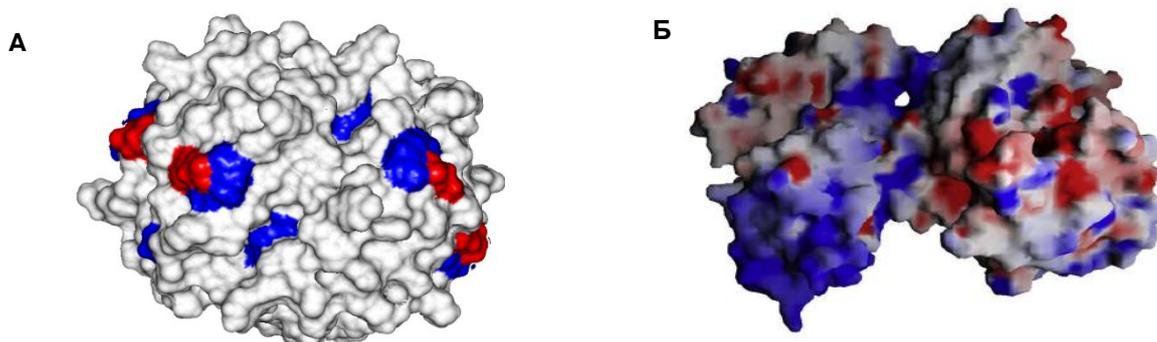


Рис. 3.7. Расположение заряженных групп на поверхности гексамера инсулина (А) и лактоферрина (Б). Синим цветом окрашены положительно заряженные остатки, красным цветом – отрицательно заряженные. Б взято из [340].

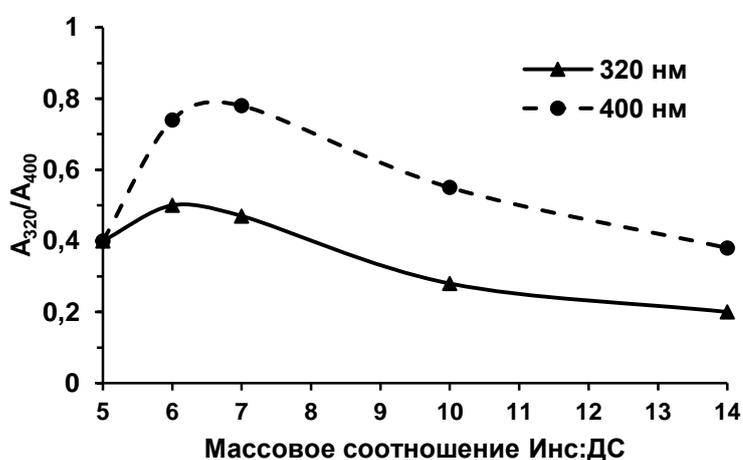


Рис. 3.8. Турбидиметрическое титрование инсулина человека декстрансульфатом 500 кДа (0,15 М NaCl, pH 3).

Таблица 3.2. Характеристика нПЭК инсулина человека и декстрансульфата (Инс_{чел}-ДС₅₀₀)

Массовое соотношение Инс _{чел} : ДС ₅₀₀	Эффективность включения, %		ζ-потенциал, мВ	Средний размер, мкм
	Инс	ДС		
7:1	38±1	67±3	+19±2	3±1
5:1	94±2	86±3	+7±1	3±2
4:1	98±3	94±4	-29±3	5±3

Исследование поверхностного заряда показало, что нейтрализация поверхности нПЭК (Инс_{чел}-ДС₅₀₀) не происходила при соотношении 7:1. По-видимому, не все заряды молекулы инсулина оказываются доступными для декстрансульфата, и гормон в силу его весового избытка при общем равном количестве зарядов с большей вероятностью оказывался на поверхности частиц. Практически нулевому ζ-потенциалу соответствовало весовое соотношение 5:1. Дальнейшее увеличение количества полианиона до 4:1 приводило к быстрому росту

отрицательного заряда. При соотношении 4:1 эффективности включения белка и декстрансульфата были максимальными, средний размер частиц с отрицательным зарядом поверхности составил 9 мкм. В среднем, с одной молекулой декстрансульфата связывалось 57 гексамеров инсулина. В дальнейшем в работе использовали нПЭК (Белок-ДС₅₀₀), полученные при весовом соотношении 4:1.

Процесс высаливания инсулина свины 0,5 М NaCl при pH 3, традиционно используемый при выделении гормона из поджелудочной железы животных, обеспечивал размер агрегатов 8 мкм (табл. 3.3). Несмотря на схожесть двух инсулинов, условия высаливания инсулина человека пришлось оптимизировать (табл. 3.3), и процесс осаждения проводили при 1 М NaCl. В выбранных условиях были сформированы аморфные микроагрегаты (Инс_{чел}), размер которых уменьшался при воздействии ультразвука, а после адсорбции декстрансульфата получены микроматрицы, обозначенные далее (Инс_{чел})-ДС₅₀₀, размером 7±3 мкм, поверхностный заряд которых при соотношении Инс_{чел}:ДС₅₀₀ равном 4:1 составлял +22±2 мВ, свидетельствуя о нахождении полианиона внутри частиц.

Таблица 3.3. Оптимизация процесса высаливания инсулина при pH 3

Инсулин	NaCl, М	Эффективность включения, %	Средний размер микроагрегатов (Инс), мкм	
			До ультразвука	После ультразвука
Свины	0,5	95±3	8±3	3±1
Человека	0,6	99±4	45±9	17±4
	0,8	100±3	20±7	10±4
	1,0	100±4	16±7	6±2
	1,7	99±5	15±8	4±2

Микроматрицы двух типов были получены с использованием хитозансульфата, однако эффективность включения гормона была меньше, а размер практически незаряженных нПЭК (Инс_{св}-ХС₁₅₀) возрастал (табл. 3.4).

Таблица 3.4. Характеристика двух типов микроматриц с инсулином человека и свины, сформированных с использованием различных полианионов (соотношение белок: ПА= 4:1)

Обозначение	Инсулин	NaCl, М	Эффективность включения белка, %	Содержание белка в препарате, %	Средний размер, мкм
Получены с использованием высаливания и адсорбции полианиона (Инс)-ПА					
(Инс _{чел})-ДС ₅₀₀	человека	1,0	82±2	76±5	7±3
(Инс _{св})-ДС ₅₀₀	свины	0,5	93±7	82±5	8±4
(Инс _{св})-ХС ₁₅₀	свины	0,5	67±4	80±8	9±5
Получены с использованием нПЭК (Инс)-ПА					
(Инс _{чел} -ДС ₅₀₀)	человека	0,15	98±3	81±5	5±3
(Инс _{св} -ДС ₅₀₀)	свины		88±8	79±6	13±5
(Инс _{св} -ХС ₁₅₀)	свины		74±6	95±8	18±9
(Инс _{чел} -Алг)	человека		81±5	78±7	31±8

С альгинатом удалось сформировать только нПЭК (Инс-Алг), имеющий размер 31 ± 8 мкм и отрицательный заряд поверхности (-17 ± 2 мВ).

Для лактоферрина, молекула которого содержит 87 остатков основных аминокислот (рис. 3.7 Б) и сохраняет положительный заряд при физиологических значениях pH, не удалось сформировать высоленные агрегаты, а микроматрицы нПЭК (ЛФ-ПА) были получены только с декстрансульфатом. Взаимодействие лактоферрина и декстрансульфата 5, 100 и 500 кДа (соответственно 15, 290 и 1350 повторяющихся звеньев в цепи) изучали при весовом соотношении 4:1 выбранном ранее для инсулина, что соответствовало их зарядовому отношению $[+]/[-] \approx 1 : 1,6$. нПЭК (ЛФ-ДС) были образованы при двух значениях pH 3 и 4 (табл. 3.5) и имели неправильную форму и размер 1 - 9 мкм. Эффективность включения лактоферрина в нПЭК (ЛФ-ДС) была высокой и не зависела от молекулярной массы полианиона. С ростом молекулярной массы декстрансульфата возрастало содержание полимера в препаратах, приводя к увеличению числа звеньев декстрансульфата, приходящихся на молекулу лактоферрина, а также размеров нПЭК (ЛФ-ДС) и абсолютных значений их отрицательного ζ -потенциала (табл. 3.5).

Таблица 3.5. Влияние молекулярной массы декстрансульфата и pH формирования на физико-химическую характеристику нПЭК (ЛФ-ДС)

нПЭК	Эффективность включения, %		Число звеньев ДС на молекулу ЛФ	ζ - потенциал, мВ	Средний размер, мкм	Удельная антиоксидантная активность ЛФ, %
	ЛФ	ДС				
Формирование при pH 3						
ЛФ-ДС ₅	98±1	82±7	49	-7±2	6±1	н/о
ЛФ-ДС ₁₀₀	87±1	84±15	58	-23±3	7±1	н/о
ЛФ-ДС ₅₀₀	91±1	95±5	57	-25±3	8±1	54±3
Формирование при pH 4						
ЛФ-ДС ₅	92±1	47±6	30	-6±1	<1,3	39±2
ЛФ-ДС ₁₀₀	91±1	55±8	36	-22±1	<2	38±1
ЛФ-ДС ₅₀₀	98±1	99±2	58	-23±2	6±1	45±1

Изучена pH-стабильность микроматриц инсулина (рис. 3.9) и лактоферрина (рис. 3.10), что важно для последующего нанесения полиэлектролитов и прогнозирования pH-стабильности мультислойных частиц. Микроматрицы инсулина двух типов с хитозансульфатом, являющимся полиамфолитом и содержащим в среднем 1,45 сульфогрупп на звено, и альгинатом, содержащим одну карбоксильную группу на звено, были менее стабильны, чем с высоко заряженным декстрансульфатом с самой высокой плотностью заряда - 2,3 сульфогруппы на звено (рис. 3.9). Наиболее устойчивым к воздействию кислых сред оказался нПЭК с декстрансульфатом 500 кДа (Инс-ДС₅₀₀), стабильный при $\text{pH} \leq 5$.

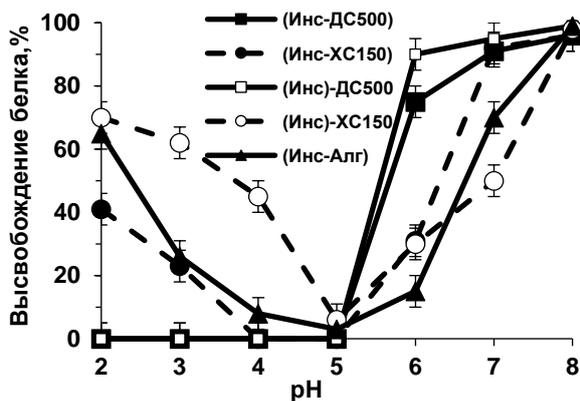


Рис. 3.9. Влияние pH среды на высвобождение инсулина свиньи из микроматриц (Инс)-ПА и (Инс)-ПА), полученных с использованием различных полианионов при инкубации в универсальном буфере в течение 1 ч.

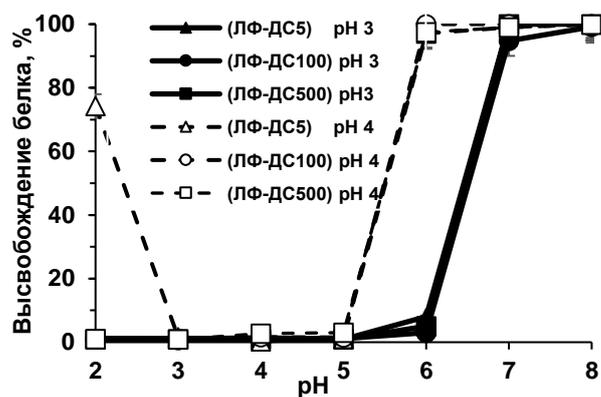


Рис. 3.10. Влияние pH среды и молекулярной массы декстрансульфата на высвобождение лактоферрина из микроматриц нПЭК (ЛФ-ДС), сформированных при pH 3 (сплошная линия) и pH 4 (пунктирная линия) при инкубации в универсальном буфере в течение 1 ч.

На поведение более стабильных нПЭК лактоферрина (ЛФ-ДС) существенное влияние оказывало значение pH формирования, в меньшей - степени молекулярная масса декстрансульфата (рис. 3.10). Профиль разрушения нПЭК смещался на одну единицу pH в кислую область при изменении pH формирования с 3 до 4. В кислых условиях наименее стабильным оказался нПЭК с низкомолекулярным декстрансульфатом 5 кДа, сформированный при pH 4, в котором на одну молекулу гликопротеина приходилось наименьшее число звеньев полианиона (табл. 3.5).

Активность лактоферрина определяли по ингибированию перекисного окисления липидов [341, 342]. Декстрансульфат сам по себе не оказывал ингибирующего действия. Включение лактоферрина в нПЭК приводило к потере от 45 до 60 % удельной активности без заметного влияния на эту характеристику молекулярной массы полианиона и величины pH формирования комплекса (табл. 3.5). Причины такого поведения не вполне ясны, но можно предположить, что определенную роль играет структура молекулы лактоферрина (рис. 3.7 Б), на поверхности которой положительный заряд распределен неравномерно, концентрируясь на N-конце (остатки 1 - 5) первой α -спирали (остатки 12–31) и локальной области между двумя долями [343]. Указанные участки могут особенно сильно связываться с декстрансульфатом, изменяя конформацию гликопротеина. Однако данные ИК-спектроскопии не подтвердили это предположение. Другим объяснением может служить расположение железо-связывающих сайтов, которые находятся в углублении между доменами молекулы лактоферрина, по одному в каждой доле. Каждый атом железа координирован четырьмя белковыми лигандами, а именно двумя атомами кислорода

фенолят-ионов Tug₉₂ и Tug₁₉₂ (Tug₄₄₇ и Tug₅₄₀ в С-доле соответственно), атомом азота имидазола His-253 (His-609) и карбоксильным кислородом Asp₆₀ (Asp₄₀₇) [344]. Весьма вероятно, что декстрансульфат, взаимодействуя с остатком гистидинов железо-связывающих сайтов, препятствует связыванию железа. В пользу этого предположения свидетельствовало понижение активности лактоферрина, включенного в растворимые комплексы с сульфополианионами другого строения, в частности, с сульфосукцинилхитозаном и хитозансульфатом [345].

Таким образом, получение микроматриц в виде нПЭК белков (Белок- ПА) при низких ионных силах растворов, по сравнению с использованием высаливания белков, оказалось более простым и универсальным процессом, пригодным для кислого инсулина и основного лактоферрина, полианионов с различной плотностью зарядов. Белоксодержащие матрицы, сформированные с использованием декстрансульфата, оказались наиболее стабильными в кислых условиях.

3.1.2.2. Послойная адсорбция полиэлектролитов для получения стабильных микрочастиц с белком, чувствительных к изменению pH

Послойная адсорбция полиэлектролитов исследована на предложенных белоксодержащих матрицах с использованием трех ранее упомянутых полианионов и двух поликатионов разной природы: мукоадгезивного хитозана 22, 150, 400, 600 кДа (Хит₂₂, Хит₁₅₀, Хит₄₀₀, Хит₆₀₀) с pKa аминокрупп 6,5 и основного полипептида протамина (Пр, 5 кДа, pI 10,5), содержащего до 70 % аргинина и обладающего меньшей токсичностью по сравнению с синтетическими полипептидами.

При применении микроматриц (Белок)-ПА и (Белок-ПА) происходило изменение поверхностного заряда с положительного при адсорбции поликатионов на отрицательный при адсорбции декстрансульфата и альгината или слабо положительный при адсорбции хитозансульфата (рис. 3.11).

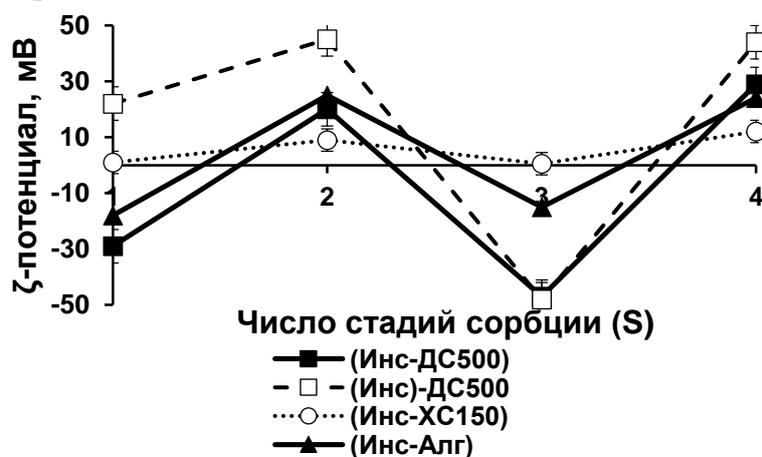


Рис. 3.11. Изменение ζ-потенциала микрочастиц при послойной адсорбции в 0,15 М NaCl, pH 3 различных полианионов (S=1, 3) и хитозана 400 кДа (S=2, 4) на микроматрицы инсулина (Инс)-ПА и (Инс-ПА).

Эффективность включения и содержание инсулина в микрочастицах уменьшались с увеличением числа стадий сорбции (рис. 3.12, табл. 3.6 № 10 - 13). Хитозан вытеснял инсулин больше, чем низкомолекулярный протамин (табл. 3.6 № 1 - 3, 6). Включение инсулина и размер частиц практически не зависели от молекулярной массы хитозана (табл. 3.6 № 1 - 3). Содержание белка в частицах при увеличении молекулярной массы хитозана от 150 до 400 кДа возрастало от 36 до 52 %, однако, при дальнейшем наращивании цепи до 600 кДа, снижалось до 41 %.

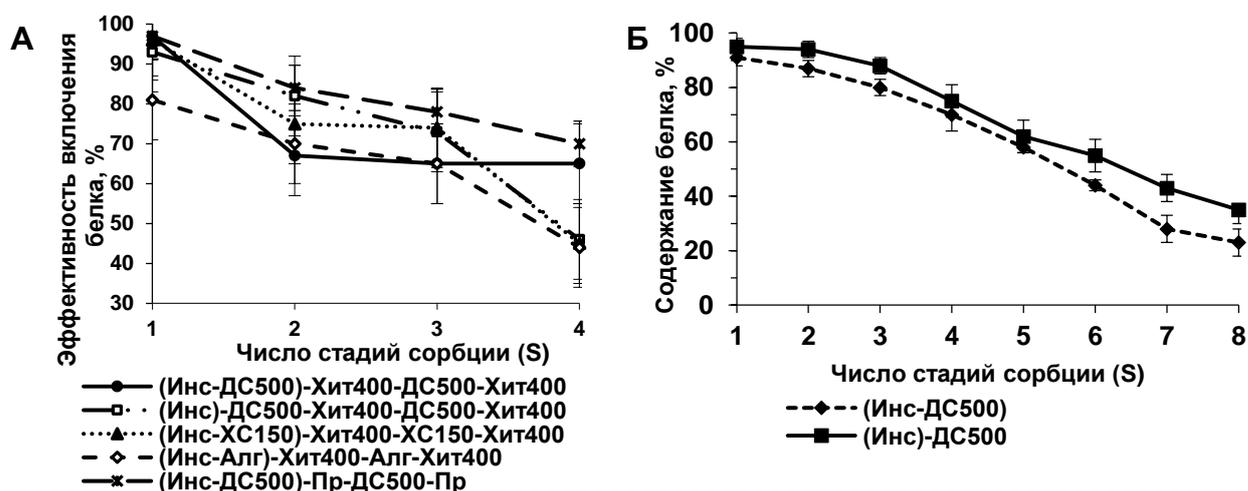


Рис. 3.12. Зависимость эффективности включения (А) и содержания инсулина свиный (Б) в микрочастицах различного состава и типа исходных матриц на стадиях сорбции полиэлектролитов. Б - микрочастицы, полученные с использованием декстрансульфата и протамина на микроматрицах (Инс)-ДС₅₀₀ и (Инс)-ДС₅₀₀).

Таблица 3.6. Свойств мультислойных микрочастиц с инсулинами свиный и человека различного состава и строения

№	Микрочастицы	Эффективность включения инсулина, %	Содержание в препарате, %			Средний размер, мкм
			Инсулин	ПА	ПК	
Инсулин свиный						
1	(Инс-ДС ₅₀₀)-Хит ₁₅₀ -ДС ₅₀₀	67±4	36±2	42±3	12±2	10±5
2	(Инс-ДС ₅₀₀)-Хит ₄₀₀ -ДС ₅₀₀	72±5	52±4	34±6	9±2	9±5
3	(Инс-ДС ₅₀₀)-Хит ₆₀₀ -ДС ₅₀₀	74±5	41±4	38±3	9±3	11±5
4	(Инс-ХС ₁₅₀)-Хит ₄₀₀ -ХС ₁₅₀	75±5	55±4	-	-	23±13
5	(Инс-Алг)-Хит ₄₀₀ -ДС ₅₀₀	70±2	41±5	-	-	36±11
6	(Инс-ДС ₅₀₀)-Пр-ДС ₅₀₀	80±6	80±3	15±2	1,1±0,1	10±1
7	(Инс)-ДС ₅₀₀ -Хит ₄₀₀ -ДС ₅₀₀	73±5	53±4	35±5	10±2	12±10
8	(Инс)-ХС ₁₅₀ -Хит ₄₀₀ -ХС ₁₅₀	43±3	58±3	-	-	13±7
9	(Инс)-ДС ₅₀₀ -Пр-ДС ₅₀₀	82±6	88±3	14±3	2,0±0,1	10±1
Инсулин человека						
10	(Инс-ДС ₅₀₀)	98±3	81±5	17±5	-	5±3
11	(Инс-ДС ₅₀₀)-Хит ₄₀₀	67±2	63±3	21±3	19±2	6±2
12	(Инс-ДС ₅₀₀)-Хит ₄₀₀ -ДС ₅₀₀	65±3	57±2	28±5	15±2	5±3
13	(Инс-ДС ₅₀₀)-Хит-ДС ₅₀₀ -Хит ₄₀₀	65±3	57±4	26±3	17±2	6±3

Для микрочастиц, сформированных на матрицах инсулина с применением высаливания (Инс)-ПА, эффективность включения белка при использовании хитозансульфата была меньше, чем при применении декстрансульфата (табл. 3.6 № 7, 8). Для микрочастиц, полученных с использованием нПЭК (Инс-ПА) со всеми полианионами, эффективности включения гормона были близки (табл. 3.6 № 3 - 5). Для микрочастиц с основным лактоферрином, сформированных на нПЭК (ЛФ-ПА) при pH 3, использование хитозана всех молекулярных масс на второй стадии сорбции не приводило к вытеснению гликопротеина из нПЭК (табл. 3.7).

Таблица 3.7. Влияние молекулярной массы полиэлектролитов на свойства микрочастиц с лактоферрином (ЛФ-ДС)-Хит, полученных при pH 3

Микрочастицы	Эффективность включения, %		ζ - потенциал, мВ	Средний размер, мкм
	Белок	ДС		
(ЛФ-ДС ₅₀₀)-Хит ₂₂	95±5	46±3	24±2	9±1
(ЛФ-ДС ₅₀₀)-Хит ₁₅₀	100±1	62±4	25±3	9±1
(ЛФ-ДС ₅₀₀)-Хит ₄₀₀	98±4	82±11	31±3	9±1
(ЛФ-ДС ₁₀₀)-Хит ₄₀₀	98±6	82±7	30±3	8±1
(ЛФ-ДС ₅)-Хит ₄₀₀	98±5	58±10	29±4	6±1

С ростом молекулярной массы хитозана положительный ζ-потенциала микрочастиц возрастал (табл. 3.7). Относительно длинные цепи хитозана 400 кДа вытесняли из нПЭК (ЛФ-ДС) декстрансульфат 5 кДа в большей степени, чем высокомолекулярные декстрансульфаты. Размер образующихся микрочастиц (ЛФ-ДС)-Хит практически совпадал с таковым для матриц нПЭК (ЛФ-ДС) (табл. 3.5). Содержание гликопротеина в микрочастицах (ЛФ-ДС₅₀₀)-Хит₄₀₀ было высоким (табл. 3.8).

Таблица 3.8. Влияние природы поликатиона и pH формирования на свойства полиэлектролитных микрочастиц с лактоферрином

Микрочастицы	pH	Эффективность включения ЛФ, %	Содержание, %			ζ - потенциал, мВ	Средний размер, мкм
			ЛФ	ДС	ПК		
(ЛФ-ДС ₅₀₀)-Хит ₄₀₀	3	98 ± 4	84 ± 2	13 ± 1	4 ± 2	30,5 ± 2,6	9 ± 1
(ЛФ-ДС ₅₀₀)-Хит ₄₀₀	4	99 ± 6	78 ± 2	17 ± 2	5 ± 3	34,7 ± 1,7	7 ± 1
(ЛФ-ДС ₅₀₀)-Пр	4	62 ± 3	75 ± 1	20 ± 1	4 ± 3	14,1 ± 0,82	5 ± 1

При получении частиц при pH 4 хитозаны всех молекулярных масс вытесняли большую часть лактоферрина (80 - 87 %) из нПЭК с декстрансульфатом 5 кДа, поэтому в микрочастицах (ЛФ-ДС₅)-Хит содержание гликопротеина не превышало 50 %. Напротив, при адсорбции хитозана 150 и 400 кДа на комплексы с декстрансульфатами 100 и 500 кДа количество высвобожденного

белка уменьшалось до 5 - 10 %. Микрочастицы с наиболее высоким содержанием лактоферрина (76 - 80 %) удалось получить, используя высокомолекулярные полисахариды (табл. 3.8).

Замена хитозана на протамин при pH 4 приводила к вытеснению 30 - 36 % лактоферрина, что обусловлено конкуренцией основных гликопротеина и полипептида. Микрочастицы (ЛФ-ДС₅₀₀)-Пр по сравнению с частицами (ЛФ-ДС₅₀₀)-Хит₄₀₀ имели меньший размер, а поскольку в молекуле протамина на единицу массы приходится меньше зарядов, чем у хитозана, величина их поверхностного заряда также была в 2,5 раза меньше (табл. 3.8).

Ни хитозан, ни протамин сами по себе не ингибировали окисление липидов, тогда как гликопротеин в микрочастицах (ЛФ-ДС₅₀₀)-Хит₅₀₀ сохранял 9±1 % и 14±3 % антиоксидантной активности соответственно при их формировании при pH 3 и 4. В микрочастицах с протамином (ЛФ-ДС₅₀₀)-Пр гликопротеин сохранял 32±1 % антиоксидантной активности, что только на 10 % ниже активности исходного комплекса (ЛФ-ДС₅₀₀), который формировали при таком же значении pH 4.

По данным КЛСМ (рис. 3.13) полиэлектролитные микрочастицы с белком, меченным ФИТЦ, повторяли форму исходных матриц, на которых они формировались, а белок был распределен по всему объему частиц. Покрытие полиэлектролитами не вызывало образование дополнительных структур из полимеров, а лишь обеспечивало их сорбцию на поверхности исходных микроматриц.

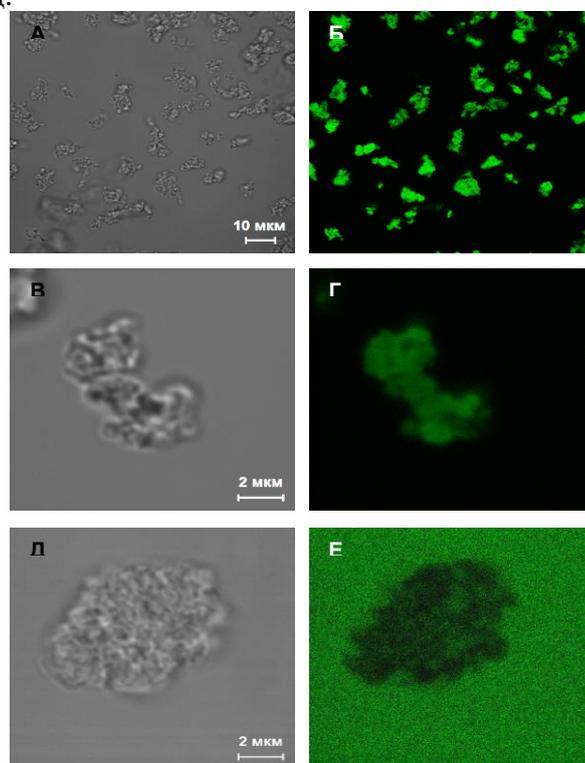


Рис. 3.13. КЛСМ фотографии микрочастиц (Инс-ДС₅₀₀)-Хит-ДС₅₀₀-Хит, полученных с использованием инсулина человека, меченого ФИТЦ, до (А - Г) и после 2 ч инкубации при pH 7,4 (Д, Е): трансмиссия (А, В, Д) и флуоресценция (Б, Г, Е).

Результаты СЭМ (рис. 3.14 А - Е) показали схожесть структур полиэлектролитных микрочастиц инсулина, полученных на матрицах (Белок)-ПА и (Белок-ПА). Однако, для микрочастиц, матрица которых была сформированных с использованием высаливания (рис. 3.14 В, Г, Е), наличие в структуре повторяющихся образований со средним размером 100 - 200 нм было более явным.

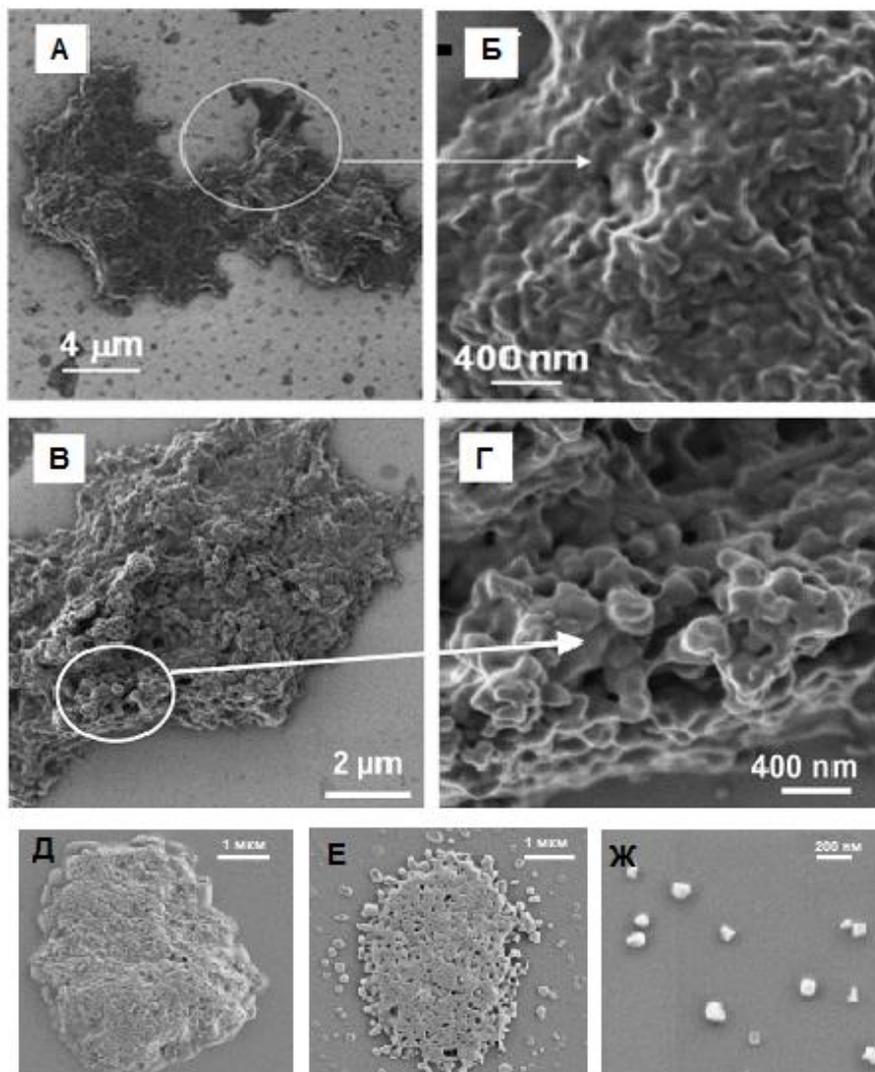


Рис. 3.14. СЭМ фотографии содержащих инсулин свиный микрочастиц с тремя стадиями сорбции полиэлектролитов, полученных на матрицах двух типов: А, Б – (Инс-ДС₅₀₀)-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀; В, Г- (Инс)-ДС₅₀₀-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀; Д - (Инс-ДС₅₀₀)-Пр-ДС₅₀₀; Е - (Инс) -ДС₅₀₀-Пр-ДС₅₀₀; Ж - (Инс) -ДС₅₀₀-Пр-ДС₅₀₀ после обработки ультразвуком.

Различия ярко проявились при обработке микрочастиц ультразвуком. Для микрочастиц, матрица которых была сформирована с использованием высаливания, процесс измельчения был более выражен, а частицы однородны по размеру (2 ± 1 мкм для (Инс)-ДС₅₀₀-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀, 3 ± 2 мкм для (Инс)-ДС₅₀₀-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀). Наиболее поразительные результаты обработки ультразвуком наблюдались для микрочастиц, полученных с использованием высолённых агрегатов инсулина с применением в качестве поликатиона протамина (Инс)-ДС₅₀₀-Пр-ДС₅₀₀, когда удалось получить

наночастицы размером 100 - 200 нм (рис. 3.14 Е, Ж). При хранении в растворе 10 мМ HCl все микрочастицы инсулина с $S \geq 3$ и лактоферрина с $S \geq 2$ до и после обработки ультразвуком сохраняли стабильность в течение трех лет наблюдений и не агрегировали.

Сравнение рН-стабильности матриц (рис. 3.15 А) и полиэлектролитных микрочастиц с инсулином (рис. 3.15 Б - Г) с целью выявления основных факторов, влияющих на высвобождение белка, выявило, что мультислойные частицы прочнее удерживали белок. Независимо от типа матриц и состава полиэлектролитов высвобождение белка в кислых и нейтральных средах уменьшалось с увеличением числа стадий сорбции полиэлектролитов за счет диффузных затруднений, создаваемых полимерной сеткой (рис. 3.15 А - Г). Молекулярная масса хитозана не оказывала существенного влияния на высвобождение белка (рис. 3.15 Б). Согласно КЛСМ (рис. 3.13 Д, Е) после высвобождения инсулина, меченного ФИТЦ, полиэлектролитные микрочастицы продолжали существовать, но их флуоресцентный сигнал был меньше, чем сигнал раствора с выделившимся белком.

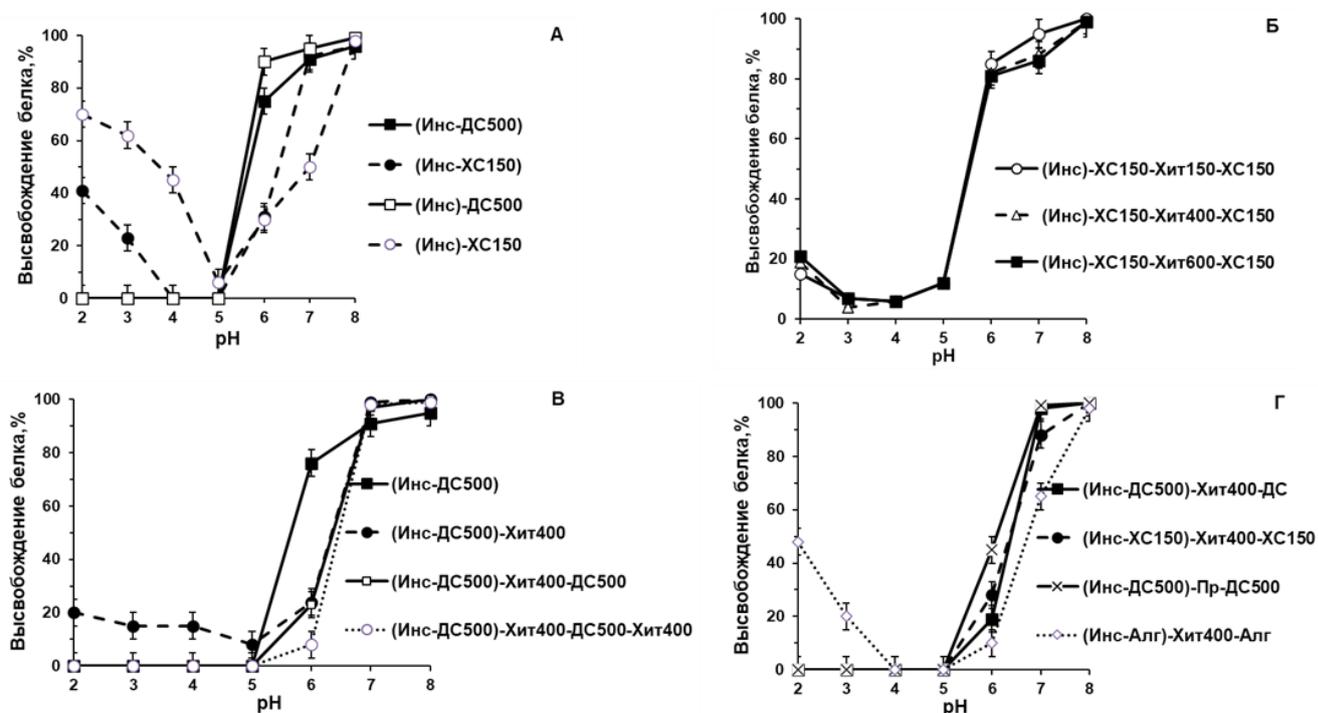


Рис. 3.15. Влияние рН на высвобождение инсулина из: А - инсулинсодержащих матриц; Б - из микрочастиц (Инс)-ХС₁₅₀-Хит-ХС₁₅₀, сформированных с использованием хитозана различных молекулярных масс; В - из микрочастиц с различным S, сформированных на (Инс)-ДС₅₀₀ с использованием декстрансульфата 500 кДа и хитозана 400 кДа; Г - из микрочастиц различного состава с S=3, сформированных на (Инс)-ПА).

Адсорбция хитозана на нПЭЖ основного лактоферрина (ЛФ-ДС) при рН 3 (рис. 3.10, 3.16 А) существенно стабилизировала микрочастицы уже при двух стадиях сорбции полиэлектролитов (S=2), приводя к сдвигу выделения белка на одну единицу рН в щелочную область.

Высвобождение лактоферрина также практически не зависело от молекулярной массы хитозана, но уменьшалось с ростом молекулярной массы декстрансульфата (рис. 3.16 А).

Формирование микрочастиц при рН 4 не приводило к изменению профиля высвобождения лактоферрина из микрочастиц (ЛФ-ДС₅₀₀)-Хит₄₀₀, образованных высокомолекулярными полисахаридами (рис. 3.16 Б), но резко сужало интервал существования стабильных частиц для микрочастиц с декстрансульфатом 5 кДа и протамином (рис. 3.16 Б).

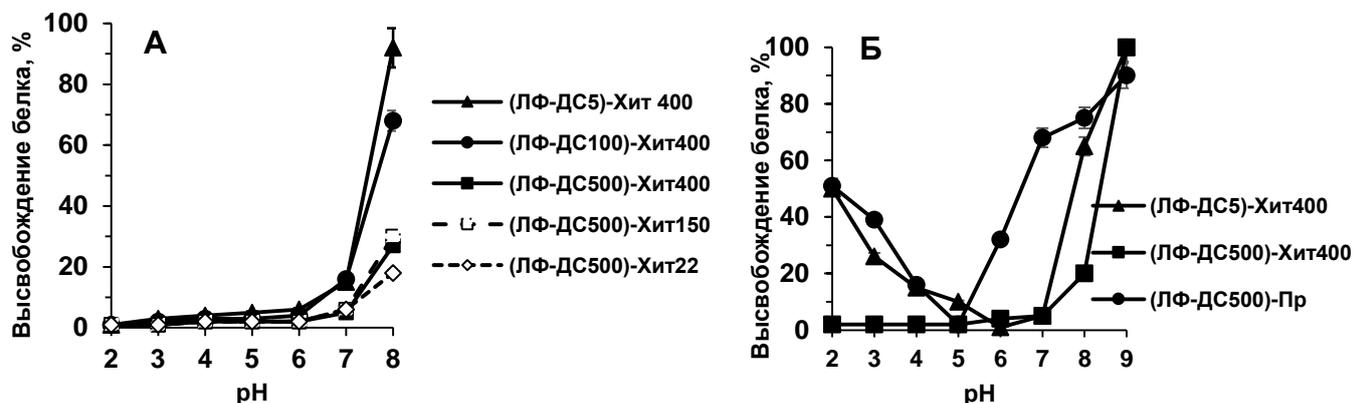


Рис. 3.16. Влияние молекулярной массы полиэлектrolитов на высвобождение лактоферрина из микрочастиц с S=2, полученных при рН 3,0 (А) и рН 4,0 (Б).

Таким образом, основными факторами, влияющими на рН-чувствительность мультислойных микрочастиц, сформированных на белоксодержащих матрицах, были природа, плотность зарядов и молекулярная масса полимеров, количество полиэлектrolитных слоев, рН среды формирования. Интенсивность рН-зависимого выделения белка уменьшалась с увеличением изоэлектрической точки белка, а для основного белка было достаточно нанесение двух полиэлектrolитных слоев.

Матрицы в виде нПЭК белка с полианионом, сформированные в физиологических условиях, оказалось пригодными для широкого круга белков и полиэлектrolитов. С использованием высокомолекулярных декстрансульфата и хитозана были получены микрочастицы с высоким содержанием белковых препаратов, стабильные в кислых средах и высвобождающие белки при рН 6 - 8, что соответствовало требованиям мукозальной, в том числе пероральной доставки БАВ. Исследование универсальности таких частиц было продолжено далее.

Следует заметить, что предложенная стратегия использования высаливания для получения матриц с последующей послойной адсорбцией полиэлектrolитов была использована позднее в ряде исследований, посвященных нано- и микрокапсулированию инсулина [346-348]. В работе [346] на высаленных микроагрегатах инсулина послойной адсорбции полияблочной кислоты 4,5 кДа и хитозана 8 кДа формировали 2 - 6 слоев. При последующей обработке микрочастиц ультразвуком размер частиц уменьшался до 200 нм. Микрочастицы оставались стабильными в узком интервале рН 4 - 5, тогда как выше и ниже этих значений происходило высвобождение

гормона, что, по-видимому, обусловлено относительно короткими цепями использованных слабых биополиэлектролитов. С увеличением числа бислоев скорость выделения инсулина из микрочастиц уменьшалась как в кислых, так и в нейтральных средах. В работе [347] на высоленные микроагрегаты инсулина адсорбировали 3 - 9 бислоев высокомолекулярного декстрансульфата и соли FeCl₃, в качестве последнего слоя использовали протамин. Скорость выделения биологически активного гормона при pH 7,4, из микрочастиц регулировалась числом полиэлектролитных слоев.

3.1.3. Особенности микрокапсулирования белков с использованием декстрансульфата и хитозана

3.1.3.1. Микрокапсулирование белков с различными физико-химическими свойствами

Возможности капсулирования с использованием нПЭК (Белок-ДС) были продемонстрированы для одиннадцати белковых препаратов с различными физико-химическими и биологическими свойствами (табл. 3.9), которые относились к различным классам: протеазы (трипсин, хмотрипсин), ингибиторы протеаз (апротинин, ингибитор Баумана-Бирк из сои (ИББ), овомукоид), гликопротеины (лактоферрин), простые белки (овальбумин, отличающиеся аминокислотными заменами в Б-цепи гексамерные инсулины свиньи и человека, а также быстродействующие мономерные аналоги инсулины аспарт и лизпро).

Микрокапсулирование осуществляли в растворе 0,15 М NaCl с pH 3 в два этапа (рис. 3.1): 1) формирование нПЭК декстрансульфата 500 кДа с белками, имеющими в этих условиях положительный заряд (табл. 3.9), 2) послойная адсорбция с использованием декстрансульфата 500 кДа и хитозана 400 кДа.

Таблица 3.9. Свойства нПЭК белка и декстрансульфата 500 кДа (Белок-ДС₅₀₀)

Белок	pI	M _w , кДа	Эффективность включения белка, %	Содержание белка в нПЭК, %		Количество молекул белка на одну молекулу ДС	Сохранение удельной активности белка после растворения нПЭК, %
				Белок	ДС		
Овомукоид	3,8	28	20±3	28	20±3	51±5	93±4
ИББ	4,2	8,0	87±3	79±3	27±1	183	96±2
Овальбумин	4,7	45	63±3	81±6	24±6	38	-
Инсулин аспарт	5,1	5,8	98±3	82±4	20±2	353	-
Инсулин лизпро	5,35	5,8	97±4	83±3	16±4	421	-
Инсулин человека	5,35	5,8	98±3	81±4	17±5	408	-
Инсулин свиньи	5,5	5,8	99±1	91±8	20±7	348	-
Химотрипсин	8,8	25	99±1	85±6	18±4	94	77±5
Трипсин	10,5	24	96±1	84±6	19±6	92	56±3
Апротинин	10,5	6,5	91±1	88±7	21±6	322	106±7
Лактоферрин	11,5	73	95±5	79±6	20±5	25	54±3

За исключением овомукоида с самой низкой изоэлектрической точкой (рI 3,8), слабо положительно заряженного при рН 3, эффективность включения всех белков в нПЭК (Белок-ДС₅₀₀) была высокой. Эффективности включения инсулинов в форме гексамера (свиньи, человека) и мономера (аспарт, лизпро) были близки. Все сформированные нПЭК имели размер от 3 до 12 мкм и характеризовались высоким содержанием белка.

В растворах декстрансульфат при рН 7 - 8 не влиял на активность белковых ингибиторов протеаз и химотрипсина, и только на 10 - 15 % подавлял активность трипсина. После растворения нПЭК (Белок-ДС₅₀₀) в 0,1 М NaOH ингибиторы протеаз полностью сохраняли активность, а активность протеаз уменьшалась до 56 % и 77 % для трипсина и химотрипсина соответственно.

Изменение свойств микрочастиц с капсулированными ферментами при послойной адсорбции полиэлектролитов показано в табл. 3.10. С увеличением числа стадий сорбции наблюдалось увеличение содержания декстрансульфата и хитозана, уменьшение содержания белка, а также уменьшение сохранения активности фермента после растворения микрочастиц, как до, так и после лиофильного высушивания препаратов. Следует заметить, что активность иммобилизованного фермента в частицах с S=6 была 6 %, через 10 минут инкубирования частиц при рН 7,8 увеличивалась до 19 %, а после разрушения частиц 0,1 М NaOH составляла 58 %.

Таблица 3.10. Влияние числа стадий адсорбции декстрансульфата 500 кДа и хитозана 400 кДа и лиофильной сушки на свойства микрочастиц с химотрипсином, полученных на нПЭК (Хим-ДС₅₀₀)

Число стадий адсорбции (S)	Эффективность включения белка, %	Содержание в препарате, %			Сохранение удельной активности фермента после разрушения частиц, %		Средний размер, мкм
		Белок	ДС	Хит	суспензия	высушенный препарат	
1	99±1	85±6	18±4	-	77±5	75±5	3±2
2	57±8	67±1	23±9	5±1	72±4	71±5	9±5
3	60±4	44±1	42±11	9±1	66±4	66±4	9±5
4	46±3	34±1	38±8	23±2	59±5	59±6	9±6
5	50±5	36±2	35±6	24±2	58±6	45±5	9±6
6	56±4	38±1	37±10	20±3	58±5	48±4	10 ±7

Сравнение свойств микрочастиц с тремя стадиями сорбции полиэлектролитов приведено в табл. 3.11. Эффективность включения всех белков превышала 50 % за исключением овомукоида, плохо включавшегося в нПЭК, и низкомолекулярного основного аprotинина, более склонного к образованию растворимых комплексов с полианами. Содержание белка в препаратах было высоким, а после разрушения частиц протеазы и ингибиторы протеаз сохраняли высокую активность. Свойства микрочастиц со всеми инсулинами были близки.

Таблица 3.11. Свойства микрочастиц (Белок-ДС₅₀₀)-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀

Белок	pI	M _w , кДа	Эффективность включения белка, %	Содержание в препарате %			Средний размер, мкм	Сохранение удельной активности белка после разрушения частиц, %
				Белок	ДС	Хит		
Овомукоид	3,8	28	15±1	н. о.	н. о.	н. о.	4±3	-
ИББ	4,2	8,0	62±5	55±4	27±3	17±2	5±1	98±2 %
Овальбумин	4,7	45	54±6	58±5	30±6	7±2	3±1	-
Инсулин лизпро	5,35	5,8	66±6	57±1	26±1	17±3	5±2	-
Инсулин аспарт	5,1	5,8	70±5	56±2	27±1	16±3	5±2	-
Инсулин человека	5,35	5,8	65±3	57±2	28±5	15±2	5±3	-
Инсулин свиньи	5,5	5,8	72±5	52±4	34±6	9±2	9±5	-
Химотрипсин	8,8	25	59±3	49±3	32±8	14±2	9±3	66±4
Трипсин	10,5	24	63±5	63±1	24±5	8±2	7±3	44±4
Апротинин	10,5	6,5	43±2	39±8	41±5	13±2	8±3	99±1
Лактоферрин	11,5	73	85±5	75±3	15±3	8±3	7±3	н. о.

Готовые полиэлектролитные микрочастицы (табл. 3.11, рис. 3.17) представляли собой образования неправильной формы размером 3 - 12 мкм. По данным СЭМ (рис. 3.17 В, Г) микрочастицы сохраняли наноструктуру, включающую образования размером 100 - 200 нм. При воздействии ультразвука в течение 1 мин размер всех микрочастиц уменьшался до 1 - 3 мкм.

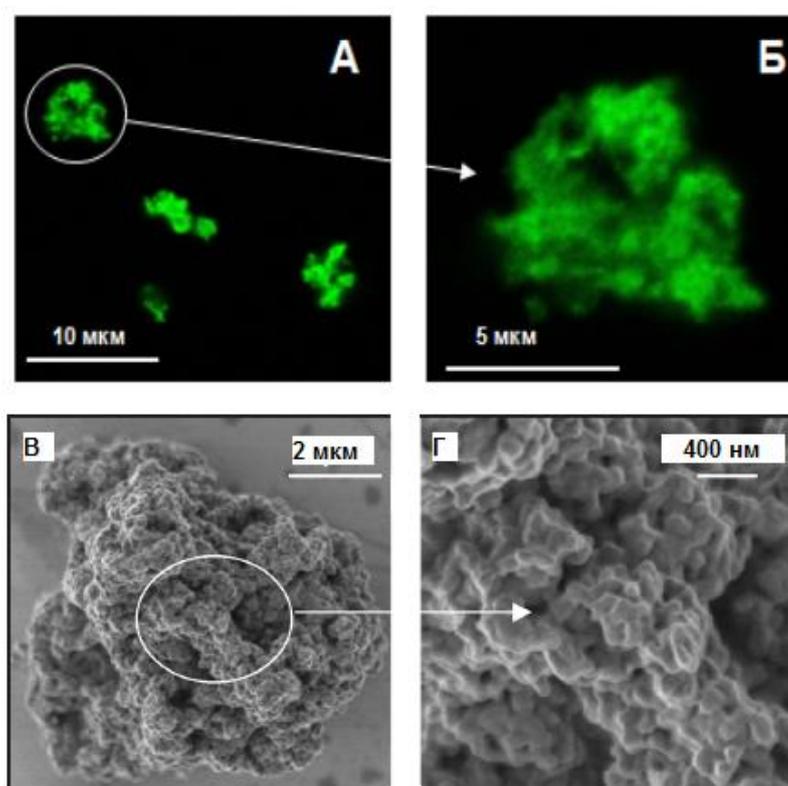


Рис. 3.17. КЛСМ (А, Б) и СЭМ (В, Г) фотографии микрочастиц с (Хим-ДС₅₀₀)-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀. Для КЛСМ суспензии содержали 10⁻⁶ М ФИТЦ.

Микрочастицы со всеми белками при хранении в суспензии были стабильны и не агрегировали в течение 3 лет наблюдений, а после лиофильного высушивания и 3-х летнего хранения при ресуспендировании сохраняли форму и средний размер.

Универсальность предложенного подхода микрокапсулирования дополнительно была продемонстрирована для веществ небелковой природы низкомолекулярных доксорубина (Докс, 540 Да, рКа 8,6) и растительных биофлавоноидов. Основными стадиями получения полиэлектролитных частиц с доксорубином были также формирование нПЭК с декстрансульфатом (Докс-ДС), послойная адсорбция декстрансульфата и хитозана, ультразвуковая обработка, что позволило получить рН-чувствительные микро- и наночастицы с высоким содержанием антрациклинового антибиотика [С15]. Для микрокапсулирования биофлавоноидов кверцетина и дигидрокверцетина был использован нПЭК их конъюгатов с низкомолекулярным хитозаном 30 кДа или триметилхитозаном 390 кДа и хитозансульфата [С34].

3.1.3.2. Совместное микрокапсулирование белков

Использование матриц в виде нПЭК позволяет иммобилизовать совместно несколько белков. Особенно актуальным может быть одновременное включение белковых ингибиторов для уменьшения возможного протеолитического расщепления целевых белков. Сравнительная характеристика свойств использованных белковых ингибиторов протеаз приведена в табл. 3.12.

Таблица 3.12. Физико-химические свойства ингибиторов протеаз

Белок	M _w , кДа	pI	K _i , M		
			Трипсин	α-Химотрипсин	Эластаза
Апротинин (Апр)	6,5	10,5	6·10 ⁻¹⁴ [243]	1,5·10 ⁻⁹ [244]	3,5·10 ⁻⁶ [244]
Овомукоид из утиных яиц	28	3,8	6,1·10 ⁻⁹ [245]	2,2·10 ⁻⁹ [245]	2,4·10 ⁻⁹ [245]
Ингибитор типа Баумана-Бирк (ИББ)	8	4,2	9·10 ⁻⁹ [246]	6,4·10 ⁻⁹ [246]	2·10 ⁻⁹ [246]
Ингибитор из сои типа Кунитца (ИТК)	20,1	4,5	3,7·10 ⁻⁹ [247]	1,0·10 ⁻⁶ ; 0,3·10 ⁻⁶ [248]*	0,2·10 ⁻⁶ [249]

* – данные по двум сайтам связывания с ферментами

Основной апротинин с одним активный центром наиболее эффективно ингибирует трипсин. Ингибитор Баумана-Бирк из сои (ИББ) содержит два активных центра, один из которых взаимодействует с трипсином, а другой - с химотрипсином. Из трех активных центров овомукоида два связывают трипсин, один - химотрипсин. ИББ и овомукоид также являются эффективными ингибиторами эластазы. Помимо индивидуальных ингибиторов был использован, разработанный автором [С38], белковый экстракт из сои (экстракт ИББ/ИТК), содержащий 15 % ИББ и 14 %

ингибитора трипсина типа Кунитца (ИТК) с двумя активными центрами одновременного связывания трипсина и химотрипсина (табл. 3.12).

Изучено два варианта включения белковых ингибиторов протеаз в полиэлектролитные микрочастицы с инсулином человека при формировании нПЭК (Инс/ИП-ДС₅₀₀) и в качестве поликатиона при послойной адсорбции полиэлектролитов.

При формировании нПЭК (Инс/ИП-ДС₅₀₀) использовали массовые соотношения Инс : ИП от 40 : 1 до 10 : 1. Свойства микрочастиц, содержащих инсулин и ингибиторы, с четырьмя стадиями сорбции полиэлектролитов представлены в табл. 3.13. Овомукоид с самой низкой рI, как и при индивидуальной загрузке (табл. 3.9), совместно с инсулином плохо включался в микрочастицы (24±2 %). Эффективности включения в микрочастицы инсулина и ИББ совпадали, а аprotинина и экстракта ИББ/ИТК были ниже, чем гормона. С увеличением соотношения Инс : ИП включение всех ингибиторов в микрочастицы возрастало. Состав комплексных микрочастиц был похож: 52 - 58 % инсулина, 24 - 30 % декстрансульфата и 14 - 20 % хитозана. Содержание аprotинина и ИББ варьировалось от 1,5 до 4 %, возрастающая с увеличением количества ингибитора, взятого для капсулирования. При соотношении Инс : экстракт ИББ/ИТК равном 10 : 1 суммарное содержание в микрочастицах ИББ и ИТК, измеренное по ингибированию трипсина и химотрипсина, достигало соответственно 14,3 и 4,2 % соответственно.

Таблица 3.13. Характеристика полиэлектролитных микрочастиц (Инс/ИП-ДС₅₀₀)-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀-Хит₄₀₀, содержащих инсулин и белковые ингибиторы протеаз

Ингибитор протеаз	Массовое соотношение Инс : ИП		Эффективность включения, %		Содержание в препарате, %			
	При получении ПЭК	В частицах	Инс	ИП	Инс	ИП	ДС	Хит
-	-	-	65±2	-	57±4	-	26±3	17±2
ИББ	40:1	37,9:1	62±4	65±7**	56±5	1,5±0,2**	25±5	18±6
	20:1	19,6:1	60±6	61±6**	52±6	2,7±0,3**	30±5	15±5
Экстракт ИББ/ИТК	20:1	22,4:1	54±5	50±5*/ 47±5**	56±5†	7,8±0,8*/ 2,2±0,3**	30±4	14±6
	10:1	12,0:1	56±6	46±5*/ 45±5**	58±4†	14,3±1,5*/ 4,2±0,4**	28±4	14±6
Апротинин	20:1	25,4:1	64±4	50±5*	54±5	2,2±0,2*	24±4	20±5
	10:1	13,4:1	62±5	46±5*	52±4	3,9±0,4*	27±6	17±6

* - определено по антитрипсиновой активности, ** - определено по антихимотрипсиновой активности, † - суммарное содержание белка

Включение аprotинина в качестве поликатиона на второй стадии сорбции (табл. 3.14) было низким (10±2 %), а для создания в микрочастицах соотношений Инс : ИП, аналогичных загрузке в нПЭК, требовались существенно большие количества ингибитора.

Таблица 3.14. Характеристика микрочастиц инсулина (Инс-ДС₅₀₀)-Апр-ДС₅₀₀-Хит₄₀₀ с аprotинином, включенным на второй стадии сорбции полиэлектролитов

Соотношение Инс : ИП (масс.)		Содержание, %		
При получении	В частицах	Инс	Апр	ДС
20:1	130:1	65±3	0,5±0,1	21±4
10:1	80:1	64±4	0,8±0,1	16±2
5:1	30:1	67±4	2,2±0,3	15±2

Таким образом, включение белков на стадии образования нПЭК позволило получить микрочастицы с высокой эффективностью включения как целевого белка, так и белковых ингибиторов протеаз.

3.1.3.3. Мультифункциональные свойства полиэлектролитных микрочастиц с белками

3.1.3.3.1. рН-чувствительные свойства микрочастиц

Для оценки возможности практического использования мультислойных микрочастиц проведено комплексное изучение рН-стабильности (рис. 3.18). Высвобождение всех белков из микрочастиц наблюдалось при рН > 5. Наиболее активно переходили в фазу раствора кислые белки - овалбумин, инсулин и ИББ с сохранением активности. При рН выше значений изоэлектрических точек белки приобретали суммарный отрицательный заряд и их комплекс с декстрансульфатом разрушался. Плохая растворимость инсулина вблизи его изоэлектрической точки снижала высвобождение гормона при рН 6.

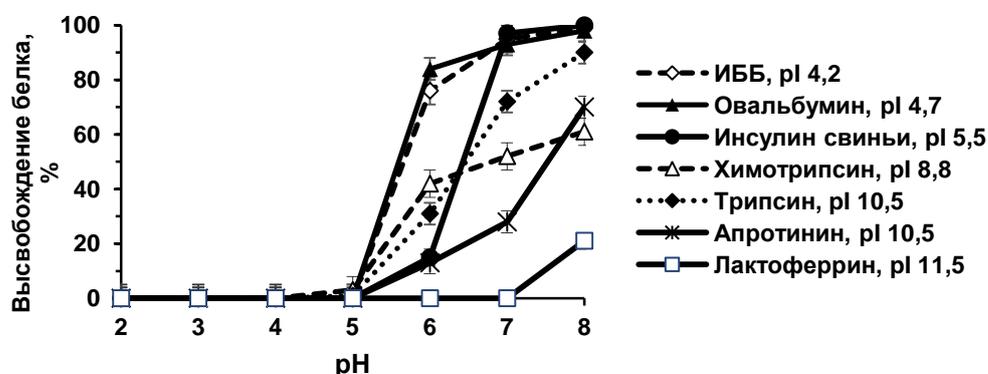


Рис. 3.18. Влияние рН на высвобождение белков из микрочастиц (Белок-ДС₅₀₀)-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀ в течение 1 ч в универсальном буфере.

Основные белки (химотрипсин, трипсин, аprotинин, лактоферрин) высвобождались при более высоких значениях рН. При этом протеазы и аprotинин сохраняли активность. Высокое значение изоэлектрических точек основных белков обеспечивало их положительный заряд при высвобождении во всем исследованном диапазоне рН, что должно способствовать образованию растворимых комплексов с полианионом. Химотрипсин с pI 8,8 высвобождался медленнее трипсина с pI 10,5, имеющего близкую молекулярную массу.

С помощью гель-фильтрации исследована форма высвобождения белков из полиэлектролитных микрочастиц в среду с рН 7,4 (рис. 3.19, 30.20). Все кислые белки выделялись

в нативном состоянии в несвязанном с полиэлектролитами виде. Инсулины свиньи и инсулин человека высвобождались в форме гексамера, а рекомбинантные аналоги лизпро и аспарт в форме мономеров (рис. 3.19). Из основных белков - аprotинин и лактоферрин (рис. 3.20) высвобождались в виде растворимого комплекса с декстрансульфатом, химотрипсин - одновременно в виде комплекса и в нативном состоянии, а трипсин - только в нативной форме.

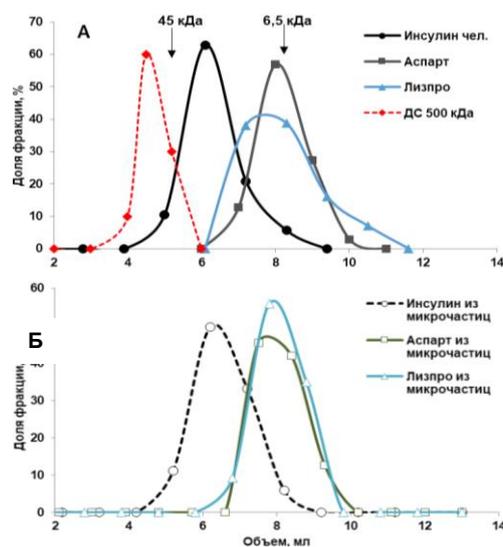


Рис. 3.19. Гель-фильтрация на сефадексе G-50sf (рН 7,4) декстрансульфата и инсулинов в растворе (А) и после высвобождения из микрокапсул (Инс-ДС₅₀₀)-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀-Хит₄₀₀ (Б).

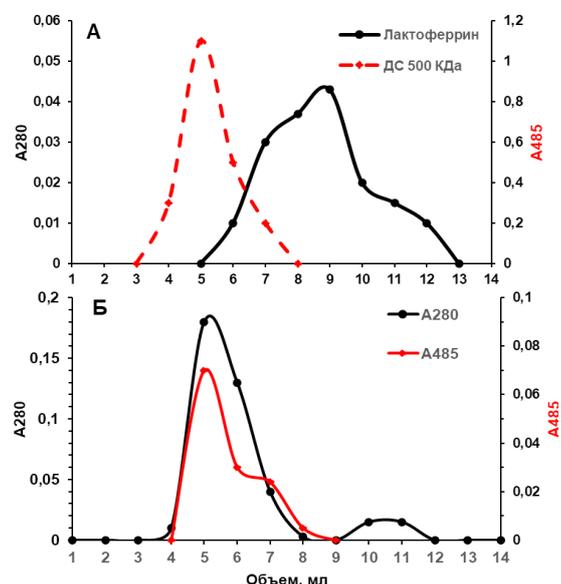


Рис. 3.20. Гель-фильтрация на сефадексе G-100sf (рН 7,4) декстрансульфата и лактоферрина в растворе (А) и компонентов после высвобождения из микрокапсул (ЛФ-ДС₅₀₀)-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀ (Б). Концентрацию белка определяли по поглощению при 280 нм, концентрацию декстрансульфата - методом Дюбуа по поглощению при 485 нм.

Увеличение количества стадий адсорбции полиэлектролитов уменьшало рН-зависимое высвобождение как кислых белков, что было ранее показано на примере инсулина человека (рис.

16 В), так и основных белков (рис. 3.21), и хорошо согласовывалось с поведением частиц, сформированных с использованием синтетических полиэлектролитов (рис. 3.4). В ряде случаев при двух слоях сорбции полиэлектролитов наблюдалось увеличение высвобождения белков при рН 2 - 5 по сравнению с нПЭК (S=1), что, по-видимому, связано с их вытеснением хитозаном с большей плотностью положительных зарядов (рис. 3.21).

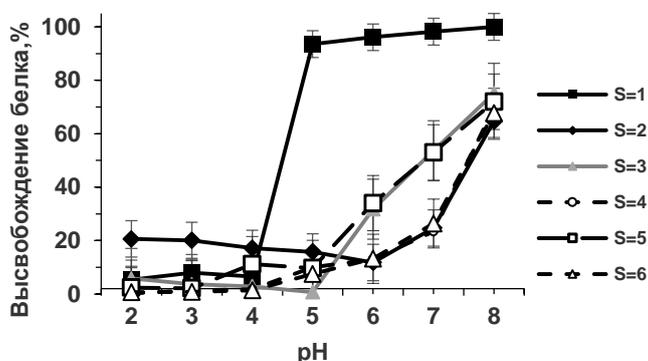


Рис. 3.21. Влияние pH и числа стадий сорбции полиэлектролитов (S) на высвобождение белка из микрочастиц с химотрипсином, полученных адсорбцией хитозана 400 кДа и декстрансульфата 500 кДа на нПЭК (Хим-ДС₅₀₀). Условия: 1 ч, универсальный буфер.

Проанализирована кинетика высвобождения инсулина человека из микрочастиц с четырьмя слоями полиэлектролитов (табл. 6 № 13) в условиях, имитирующих прохождение желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека натошак (рис. 3.22 В).

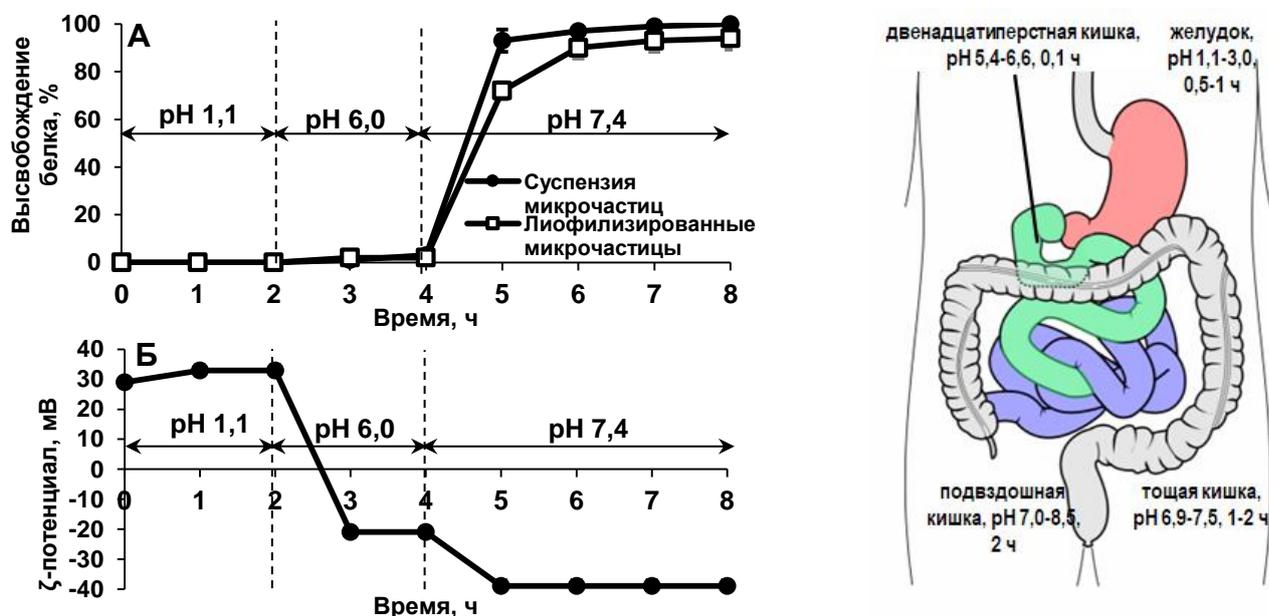


Рис. 3.22. Кинетика pH-зависимого высвобождения инсулина человека из микрочастиц (Инс-ДС₅₀₀)-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀-Хит₄₀₀ (А) и изменение их ζ-потенциала (Б) в условиях, моделирующих прохождение ЖКТ человека. В - Схема ЖКТ человека с указанием pH сред основных участков.

Частицы, хранившиеся в суспензии или после лиофильного высушивания, подвергались 2 ч воздействия pH 1,1, имитирующему кислую среду желудка, затем 2 ч pH 6,0, соответствующему среде двенадцатиперстной кишки, после этого 4 ч pH 7,4, отвечающему нижним отделам тонкого кишечника (рис. 3.22 А). Кривые высвобождения подтвердили, что гормон удерживался в частицах при pH 1,1, будучи таким образом защищенным от агрессивной среды желудка. При pH 6,0 наблюдалось незначительное, в пределах 2 - 3 %, высвобождение белка. В среде с pH 7,4 около 90 % или 72 % инсулина высвобождалось за 1 ч из частиц, не подвергнутых или подвергнутых сушке соответственно. Оставшийся инсулин постепенно выделялся из микрочастиц в течение следующих 3 ч инкубации. Лиофильная сушка микрочастиц, вызывающая реорганизацию структуры полимерной оболочки, обеспечивала пролонгированный характер высвобождения белка. Кривые высвобождения мономерных аналогов аспарт и лизпро из микрочастиц были аналогичными.

Моделирование мукозальной доставки с дополнительным введением в имитирующие растворы основного компонента всех слизистых муцина приводило к небольшому усилению выделения инсулина в кислой и слабокислой средах (до 6 - 10 %), но в целом характер высвобождения гормона оставался прежним (рис. 3.23).

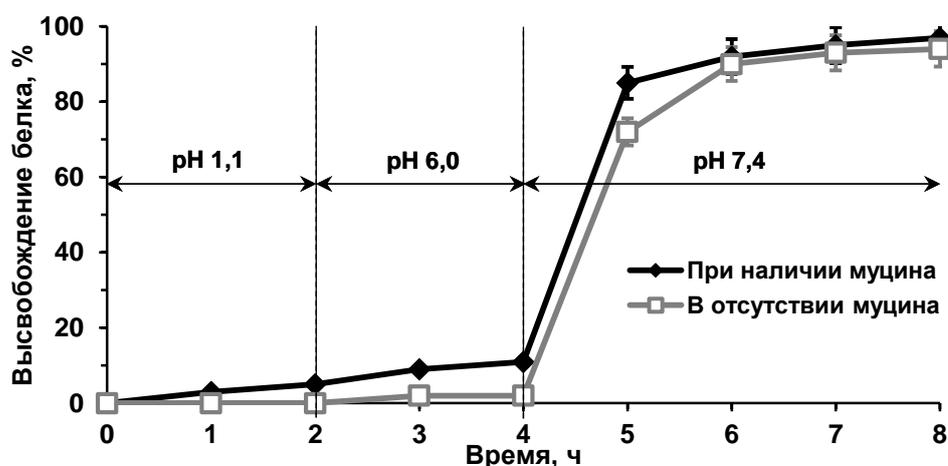


Рис. 3.23. Влияние присутствия муцина на кинетику высвобождения инсулина из лиофилизированных микрочастиц (Инс-ДС₅₀₀)-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀-Хит₄₀₀ в условиях, моделирующих прохождение ЖКТ человека.

При смене pH сред и высвобождении инсулина происходило изменение поверхностного заряда микрочастиц (рис. 3.22 Б). При pH 6,0 поверхностный заряд частиц менялся на противоположный (-20 мВ). При этом pH, близком к рK_a хитозана и pI инсулина, основной вклад в заряд частиц вносил декстрансульфат. При pH 7,4, когда инсулин приобретал еще больший отрицательный заряд и высвобождался в раствор, ζ-потенциал остатков полиэлектролитных микрочастиц становился сильно отрицательным (-39±2 мВ).

При одновременном включении в микрочастицы наряду с целевым белком ингибитора протеаз необходимо подбирать препараты с близкими значениями изоэлектрической точки (рис. 3.24), добиваясь их одновременного выделения, что было продемонстрировано на примере микрокапсулированных пар инсулин/ИББ и лактоферрин/апротинин.

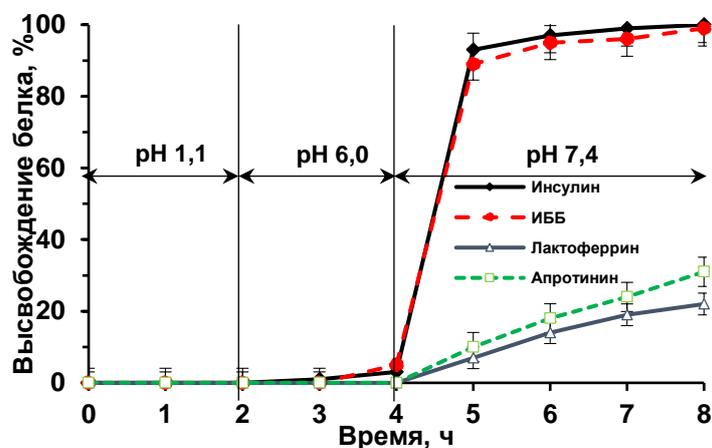


Рис. 3.24. Кинетика pH-зависимого высвобождения белков из полиэлектролитных микрочастиц, содержащих одновременно целевой белок и ингибитор протеаз: закрытые символы - частицы (Инс/ИББ-ДС)-Хит-ДС-Хит, открытые символы - (ЛФ/Апр-ДС)-Хит-ДС-Хит.

Изучение pH-чувствительных свойств показало перспективность использования микрочастиц для пероральной доставки. Далее в работе были изучены свойства мультислойных микрочастиц (мукоадгезивные, защитные, способствующих проникновению через эпителий кишечника), которые могли бы способствовать повышению биодоступности белков при мукозальной доставке.

3.1.3.3.2. Мукоадгезивные свойства полиэлектролитных микрочастиц

Для сравнения мукоадгезивных свойств микрочастиц с тремя и четырьмя стадиями сорбции полиэлектролитов, покрытых соответственно декстрансульфатом и хитозаном, характеристика которых ранее представлена в табл. 3.6 (№ 12, 13), изучена адсорбция муцина из околоушных желез (рис. 3.25 А) и муцина из желудка. Насыщение поверхности частиц наблюдалось при связывании муцина в количестве 200 мкг/мг частиц. Для микрочастиц, покрытых хитозаном, это подтверждалось изменением поверхностного заряда частиц (рис. 3.25 Б) с 29 ± 3 мВ до -43 ± 1 мВ, соответствующего заряду муцина из околоушных желез (-39 ± 5 мВ). Микрочастицы, покрытые декстрансульфатом, с отрицательно заряженной поверхностью, адсорбировали муцин в два раза меньше, а их ξ -потенциал при этом не изменялся. При использовании муцина из желудка свиньи (200 мкг/мг частиц) связывание составляло 17 ± 10 и 86 ± 15 мкг/мг частиц, покрытых декстрансульфатом и хитозаном соответственно.

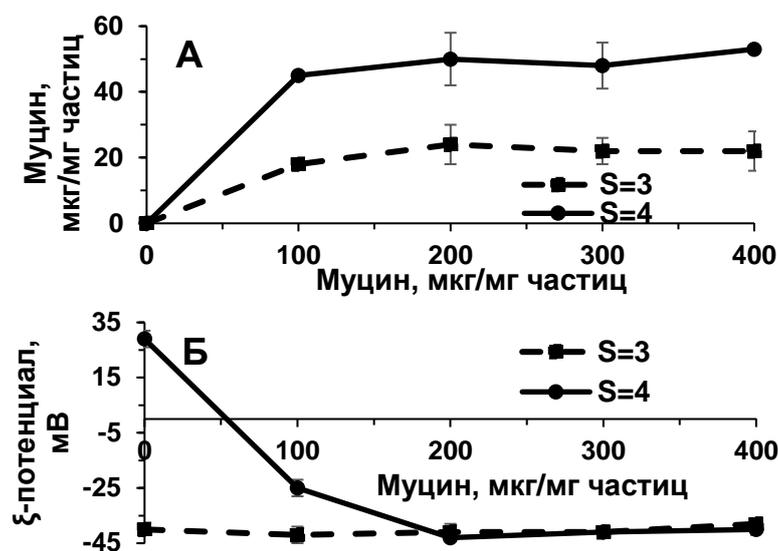


Рис. 3.25. Связывание муцина из околоушных желез (А) и изменение поверхностного заряда (Б) полиэлектролитных микрочастиц инсулина, покрытых декстрансульфатом (S=3) и хитозаном (S=4). Условия: частицы 1,3 мг/мл, рН 7,0, 1 ч, 37 °С.

Следует заметить, что сорбция муцина частицами с поверхностным слоем из хитозана была больше аналогичной величины для микрочастиц близкого размера, полученных в [214] распылительной сушкой биополимера (50 мкг/мг частиц).

После полного высвобождения инсулина из микрочастиц с наружным слоем из хитозана, когда их поверхностный заряд достигал -40 ± 5 мВ (рис. 3.22 Б), сорбция муцина из желудка свиньи уменьшилась до 19 ± 4 мкг/мг частиц. Таким образом, мукоадгезивные свойства микрочастиц, покрытых хитозаном, после высвобождения белка уменьшались и приближались к свойствам микрочастиц, покрытых полианионом (рис. 3.25 А).

Использование хитозана на последней стадии сорбции должно способствовать проявлению мукоадгезивных свойств микрочастиц преимущественно в нейтральной среде. Ослабленная адгезия таких частиц к стенкам желудка будет определяться сильноокислой средой, при которой муцин с рН 3 - 4 имеет общий положительный заряд, что осложняет его контакт с частицами, покрытыми хитозаном.

3.1.3.3.3. Ca^{2+} -связывающие свойства полиэлектролитных микрочастиц

Связывание ионов Ca^{2+} полиэлектролитными частицами важно для уменьшения концентрации катиона вблизи эпителия кишечника, что должно способствовать раскрытию плотных клеточных контактов и увеличению проницаемости эпителия для молекул белка [349, 350]. Микрочастицы, содержащие хитозан на поверхности, связывали Ca^{2+} в 2 раза хуже, чем покрытые декстрансульфатом, соответственно $4,4 \pm 0,4$ и $10,0 \pm 0,5$ мкг Ca^{2+} /мг частиц. Взаимодействие Ca^{2+} с хитозаном возможно за счет свободной электронной пары на атоме азота

[351], в то время как связывание с декстрансульфатом осуществляется за счет более сильных ионных взаимодействий. После высвобождения инсулина микрочастицами, покрытыми хитозаном (рис. 3.23), сорбция Ca^{2+} возросла до $10,6 \pm 1,2$ мкг/мг, соответствующая связыванию частицами с внешним слоем из декстрансульфата. Вероятно, после выделения инсулина, хитозан в полиэлектролитном комплексе не может компенсировать отрицательный заряд полианиона, и декстрансульфат выходит на поверхность частиц, увеличивая их Ca^{2+} -связывающую способность.

С учетом содержания хитозана в микрочастицах (Инс-ДС₅₀₀)-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀-Хит₄₀₀ связывание Ca^{2+} составило 31 мкг/мг поликатиона. Для сравнения, изобутилцианоакрилатные наночастицы размером 300 нм, покрытые хитозаном, связывали Ca^{2+} в количестве 67 мкг/мг хитозана [268]. Дополнительное связывание Ca^{2+} могло также оказывать влияние на уменьшение активность протеолитических ферментов.

3.1.3.3.4. Защитное действие полиэлектролитных микрочастиц

Исследование защитного действия микрочастиц включало анализ протеолиза капсулированного инсулина под действием пепсина желудка, обладающего широкой специфичностью и способного гидролизовать молекулу гормона в 7 сайтах по цепи А и 9 сайтах по цепи В [352], трипсина и химотрипсина активных в кишечнике, а также оценку влияния совместного микрокапсулирования белковых ингибиторов протеаз на этот процесс.

Защитное действие полиэлектролитных микрочастиц (Инс-ДС₅₀₀)-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀-Хит₄₀₀, покрытых хитозаном, было изучено в трех модельных средах (табл. 3.15), соответствующих: 1) действию пепсина в желудочном соке [333]; 2) короткому совместному действию высоких концентраций трипсина и химотрипсина в соке поджелудочной железы [254]; 3) длительному воздействию трипсина в условиях, соответствующих средним и нижним отделам тонкого кишечника [334].

Таблица 3.15. Протеолиз инсулина человека в модельных средах различных отделов ЖКТ

Моделируемая среда	Условия	Время, ч	Недеградированный инсулин, %	
			Раствор инсулина	(Инс-ДС ₅₀₀)-Хит ₄₀₀ -ДС ₅₀₀ -Хит ₄₀₀
Желудочный сок	пепсин 2,88 Ед/мл, рН 1,2	2	0	98±4
Сок поджелудочной железы	трипсин 700 БАЭЭ Ед/мл, химотрипсин 4 БТЭЭ Ед/мл, рН 7,1	2	0	21±2
Просвет тонкого кишечника	трипсин 140 БАЭЭ Ед/мл, рН 7,8	6	24±2	52±2

Микрочастицы защищали инсулин от действия пепсина желудка, уменьшали на 79 % протеолиз при высоких концентрациях протеаз сока поджелудочной железы и на 48 % при длительном воздействии трипсина в модельной среде просвета тонкого кишечника.

Для уменьшения протеолиза капсулированного белка было изучено наличие в составе мультислойных частиц белковых ингибиторов протеаз. Анализ протеолиза инсулина в растворе в присутствии ингибиторов протеаз продемонстрировал, что апротинин в условиях сока поджелудочной железы более эффективно предотвращал деградацию гормона при соотношении 10 : 1, чем ИББ при соотношении 40 : 1 (рис. 3.26 А). Однако, капсулированный при аналогичных соотношениях ИББ, оказывал более выраженное защитное действие. По-видимому, одновременное высвобождение из частиц инсулина и ИББ с близкими значениями изоэлектрических точек (рис. 3.24) определяло более эффективное действие этого ингибитора.

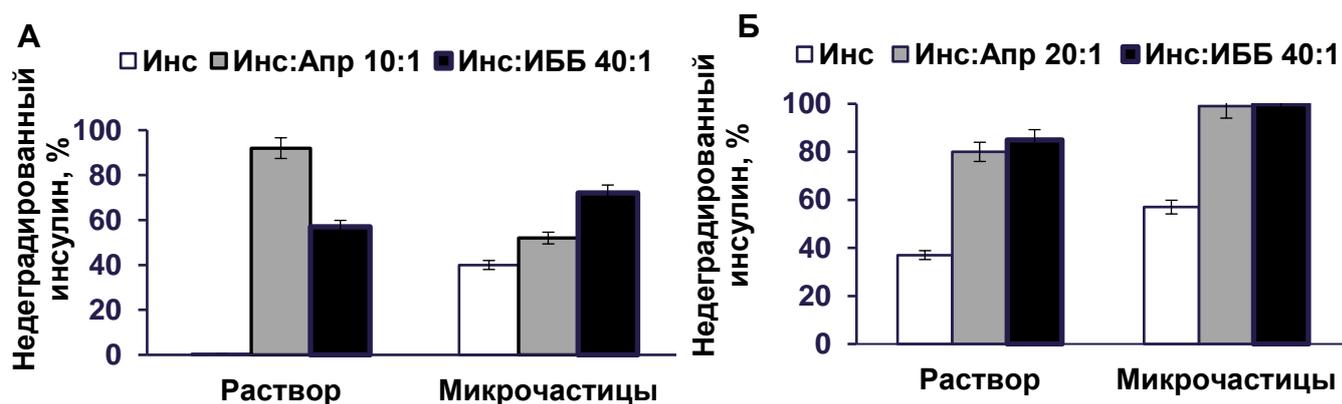


Рис. 3.26. Влияние присутствия ингибиторов протеаз на протеолиз инсулина человека в растворе и в микрочастицах (Инс/ИП-ДС₅₀₀)-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀-Хит₄₀₀ в условиях: А - сока поджелудочной железы; Б - просвета средних и нижних отделов тонкого кишечника.

В условиях, моделирующих длительное воздействие трипсина в тонком кишечнике, наличие ингибиторов протеаз в растворе ослабляло протеолиз нативного инсулина, а включение тех же количеств ингибиторов в микрочастицы полностью защитило гормон от протеолиза (рис. 3.26 Б).

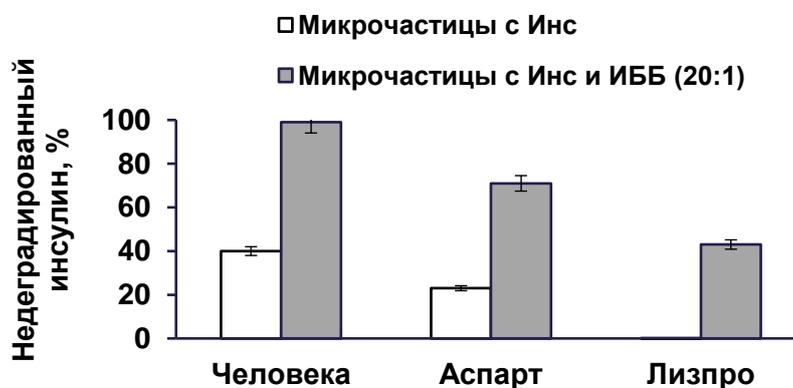


Рис. 3.27. Протеолиз капсулированных рекомбинантных инсулинов в микрочастицах (Инс/ИП-ДС₅₀₀)-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀-Хит₄₀₀ в условиях сока поджелудочной железы (рН 7,1, 1 ч).

Быстродействующие мономерные аналоги инсулина, высвобождающиеся из микрочастиц в виде мономеров, в большей степени подвержены протеолизу по сравнению с инсулином человека, который выделяется в гексамерной форме. Для микрочастиц с инсулинами аспарт и лизпро было изучено защитное действие ИББ, которое проявлялось при меньшем соотношении к целевому белку по сравнению с аprotинином. В условиях, соответствующих соку поджелудочной железы, капсулированные мономерные инсулины разрушались практически полностью (рис. 3.27). Наличие в микрочастицах ИББ, включенного в нПЭК при соотношении Инс : ИП равном 20 : 1, ослабляло действие протеаз на инсулины аспарт и лизпро на 48 и 43 % соответственно.

Таким образом, существенно сократить протеолиз целевых белков позволяет как послойная адсорбция полиэлектролитов, так одновременное включение в частицы белковых ингибиторов протеаз с значением изоэлектрических точек близким к целевому белку.

3.1.4. Принцип действия контейнеров в виде полиэлектролитных микрочастиц с белками при пероральном введении

Обобщая результаты анализа свойств многофункциональных белковых микрочастиц, полученных на нПЭК послойной адсорбцией высокомолекулярных декстрансульфата и хитозана с поверхностным слоем из хитозана, принцип их действия в виде контейнеров при пероральном введении можно представить следующим образом (табл. 3.16, рис. 3.28). Мультислойные микрочастицы защищают капсулированный белок от воздействия кислой среды желудка, содержащей пепсин. Микро размер частиц и положительный заряд поверхности за счет наличия хитозана обеспечивают плотный контакт микрочастиц со слизистой оболочкой эпителия кишечника, содержащей муцин. По мере продвижения по тонкому кишечнику с увеличением рН среды выше 6 происходит постепенное и одновременное высвобождение целевого белка и ингибитора протеаз из микрочастиц.

Таблица 3.16. Изменение свойств микрочастиц с инсулином человека (Инс-ДС₅₀₀)-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀-Хит₄₀₀ при моделировании прохождения ЖКТ

Характеристика	Исходные	После прохождения ЖКТ
Содержание инсулина, %	52±6	0
Средний размер, мкм	6±3	5±4
ζ-потенциал, мВ	32±2	-43±1
Связывание муцина, мкг/мг частиц	50±1	24±8
Связывание Са ²⁺ , мкг/мг частиц	2,8±0,1	10,6±1,2

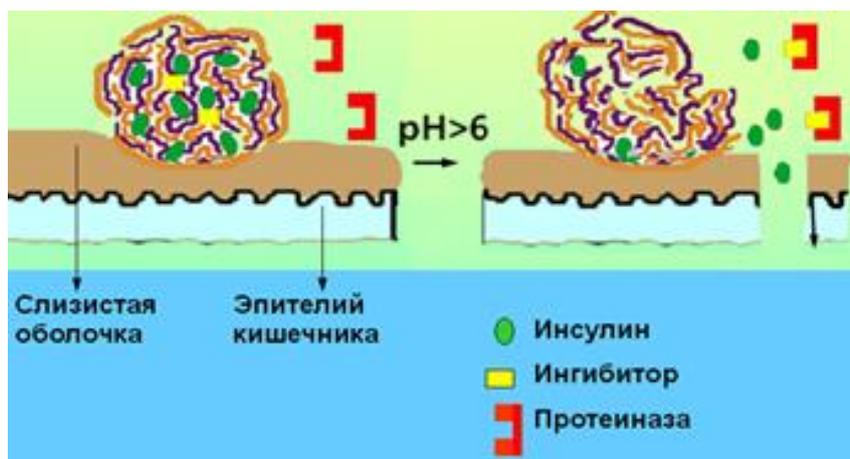


Рис. 3.28. Предполагаемый принцип действия в тонком кишечнике человека мультислойных микрокапсул с инсулином и белковым ингибитором протеаз (Инс/ИП-ДС₅₀₀)-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀-Хит₄₀₀.

Локальное выделение небольших количеств белкового ингибитора протеаз должно дополнительно уменьшить воздействие на целевой белок протеаз сока поджелудочной железы, не нарушая процесс пищеварения процесса и помогая высвобождению активного препарата вблизи слизистой поверхности тонкого кишечника. Присутствие хитозана и декстрансульфата, связывающих ионы кальция, должно способствовать открытию плотных межклеточных контактов эпителия и парацеллюлярному транспорту целевого белка [353]. Изменение поверхностного заряда и уменьшение мукоадгезивных свойств микрочастиц после полного высвобождения целевого белка должно способствовать выведению остатков полиэлектролитных частиц из тонкого кишечника.

3.1.5. Биологическое действие полиэлектролитных микрочастиц с инсулином *in vivo*

Для подтверждения эффективности выбранной стратегии микрокапсулирования с использованием нПЭК белка и послойной адсорбции полиэлектролитов исследовали биологическое действие 4-х слойных микрочастиц инсулина человека (Инс-ДС₅₀₀)-Хит₄₀₀-ДС₅₀₀-Хит₄₀₀, покрытых хитозаном, характеристика которых приведена в табл. 3.6, показавших рН-чувствительные, мукоадгезивные и защитные свойства, способствующие повышению биодоступности инсулина при мукозальной, в том числе пероральной доставке.

Сохранение биологической активности определяли на здоровых кроликах путем сопоставления гипогликемического действия микрокапсулированного инсулина и раствора инсулина в 0,15 М NaCl с рН 3,0 при подкожном введении в дозе 4 МЕ/кг через 1 и 2 ч (рис. 3.29). По результатам сопоставления уровня снижения глюкозы через 1 ч инсулином в растворе и в составе микрочастиц биологическая активность капсулированного гормона составила 106±15 %,

что свидетельствовало о полном сохранении активности гормона в процессе получения мультислойных микрочастиц.

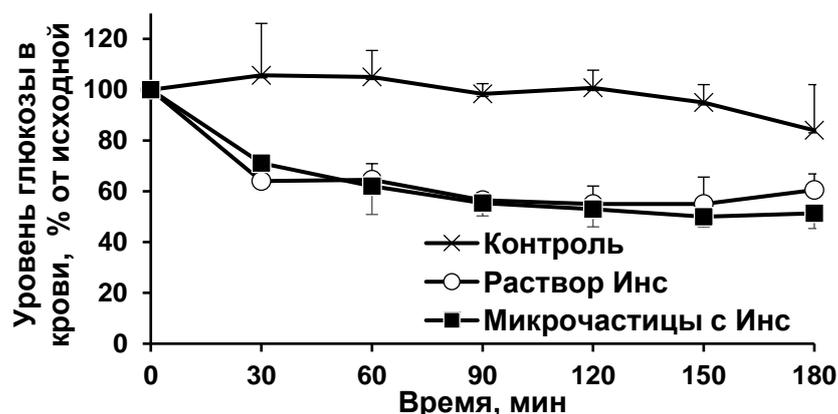


Рис. 3.29. Гипогликемическое действие инсулина в растворе и микрочастицах при подкожном введении здоровым кроликам в дозе 4 МЕ/кг ($n \geq 4$). Контрольная группа получала инъекцию раствора 0,15 М NaCl, pH 3,0.

Гипогликемический эффект инсулина при пероральном введении здоровым кроликам изучали в дозе 4 МЕ/кг, аналогичной дозе при подкожном введении. Животные, получавшие перорально микрокапсулированный инсулин, были разбиты на две группы по исходному уровню глюкозы в крови: I группа более 5,5 мМ и II группа менее 5,5 мМ (рис. 3.30). Данный уровень глюкозы натощак считается границей преддиабетического состояния у людей [354] и находится около верхней границы нормы для животных.

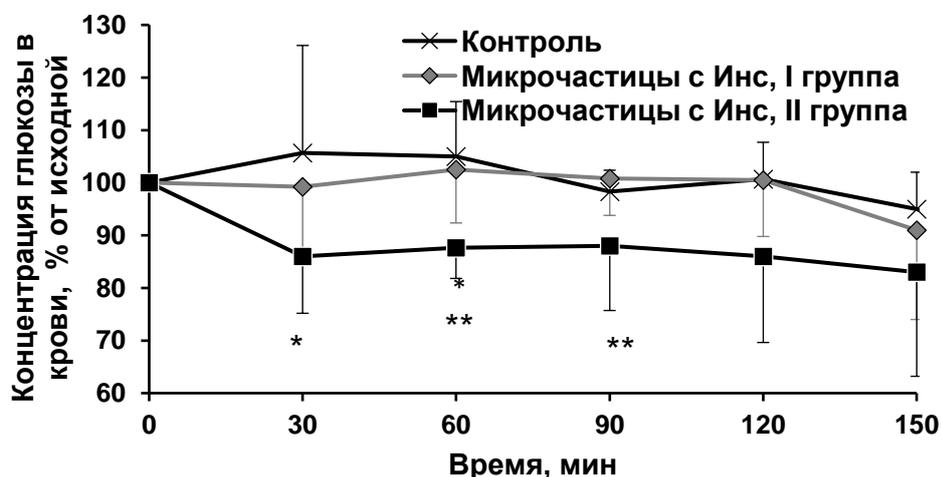


Рис. 3.30 Гипогликемическое действие микрокапсулированного инсулина после перорального введения здоровым кроликам в дозе 4 МЕ/кг ($n \geq 6$). I группа - животные с исходным уровнем глюкозы менее 5,5 мМ, II группа - животные с исходным уровнем глюкозы более 5,5 мМ. Контрольная группа получала перорально раствор 0,15 М NaCl, pH 3,0.

* - статистически значимое отличие между II группой и контрольной группой ($p < 0,05$); ** - статистически значимое отличие между I группой и II группой ($p < 0,05$).

Животные в контрольной группе перорально получали раствор 0,15 М NaCl, pH 3,0. В группе животных с нормальной концентрацией глюкозы в крови гипогликемического эффекта не наблюдалось. В группе животных с повышенной концентрацией глюкозы в течение 2 ч наблюдалось снижение уровня глюкозы на 17 %. Достоверность эффекта подтверждалась статистической значимостью отличия уровней глюкозы в группе II во всех точках вплоть до 90 мин. Полученные результаты согласовывались с описанными в литературе свойствами перорально вводимого инсулина, когда наличие гипогликемического эффекта наблюдается только у здоровых животных с повышенным уровнем глюкозы и животных, страдающих диабетом [355].

Фармакологическое действие микрокапсулированного инсулина на крысах со стрептозотоцин индуцированным диабетом с концентрацией глюкозы в крови более 13 мМ изучали в двух экспериментах: натощак и в хроническом опыте при постоянном приеме пищи.

Натощак животным (рис. 3.31) перорально вводили капсулированный инсулин в дозах 10 и 25 МЕ/кг в двух опытных группах или раствор 0,15 М NaCl, pH 3,0 в контрольной группе. В группе сравнения растворенный инсулин вводили подкожно в дозе 2,5 МЕ/кг. Снижение уровня глюкозы в плазме крови при пероральном введении по сравнению с контрольной группой наблюдалось в обеих исследованных дозах. Статистически значимое снижение глюкозы на 50 % и 45 % для дозы 25 Ед/кг было через 2 и 4 ч (по критерию Манна-Уитни для сравнения независимых выборок).

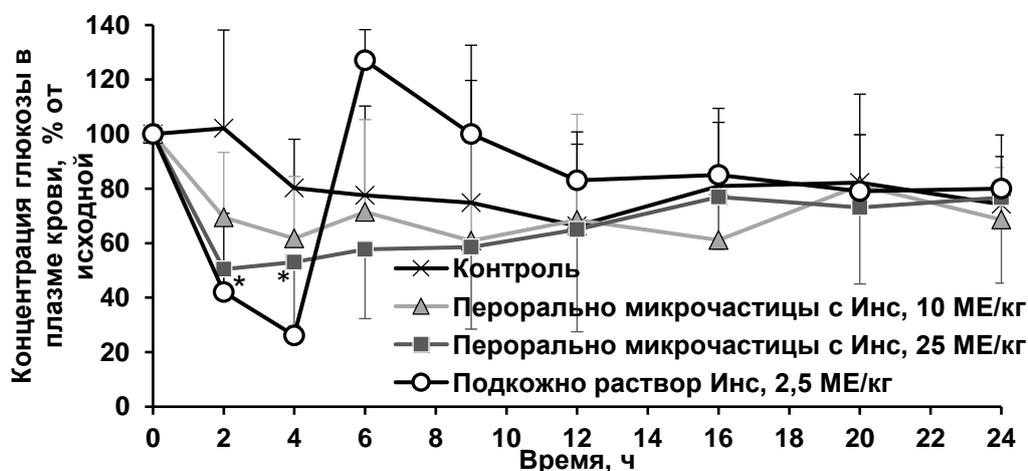


Рис. 3.31. Гипогликемическое действие перорально и подкожно введенных препаратов инсулина на крысах с диабетом натощак ($n \geq 5$). Контрольная группа получала перорально раствор 0,15 М NaCl, pH 3,0.

* - статистически значимое отличие группы, получившей перорально 25 МЕ/кг капсулированного инсулина от контрольной ($p < 0,05$).

Биодоступность перорально введенного капсулированного инсулина в дозе 25 МЕ/кг по сравнению с подкожным введением гормона в дозе 2,5 МЕ/кг была рассчитана с учетом разности доз, как отношение площадей над кривыми при двух путях введения, и составила 10,7 %. Биодоступность микрокапсулированного инсулина была близка к биодоступности коммерческого

препарата пульмонарного инсулина Exubera (10 %) [356] и была в два раза выше биодоступности инсулина, включенного Sarmiento В. и др. [357] методом ионотропного гелеобразования в наночастицы размером 500 нм из аналогичных биополимеров (табл. 3.17).

Таблица 3.17. Сравнение свойств инсулин-содержащих частиц, полученных с использованием декстрансульфата 500 кДа и хитозана 400 кДа

Характеристика	Микрочастицы (Инс-ДС)-Хит-ДС-Хит	Наночастицы (Инс-ДС-Хит) [356]
Размер, мкм	3 - 9	0,5
Содержание инсулина, %	57	2,3
ζ-Потенциал, мВ	+ 29	- 20
Гипогликемический эффект, ч	12	24
Биодоступность, %	10,7	5,6

В хроническом эксперименте крысы с диабетом имели постоянный доступ к воде и еде (*ad libitum*). Животные получали 2 раза в сутки (перерыв между введениями 6 ч) перорально капсулированный инсулин в дозах 25, 50, 100 МЕ/кг в опытной группе или раствор 0,15 М NaCl с рН 3,0 в контрольной группе. Контроль уровня глюкозы в крови проводили ежесуточно до и через 1, 6 и 24 ч после первого суточного введения препарата. Данные об изменении уровня глюкозы в крови животных после введения микрокапсулированного инсулина в дозе 100 МЕ/кг в течение 4 суток подряд (6 - 9 сутки) представлены на рис. 3.32, 3.33 А.

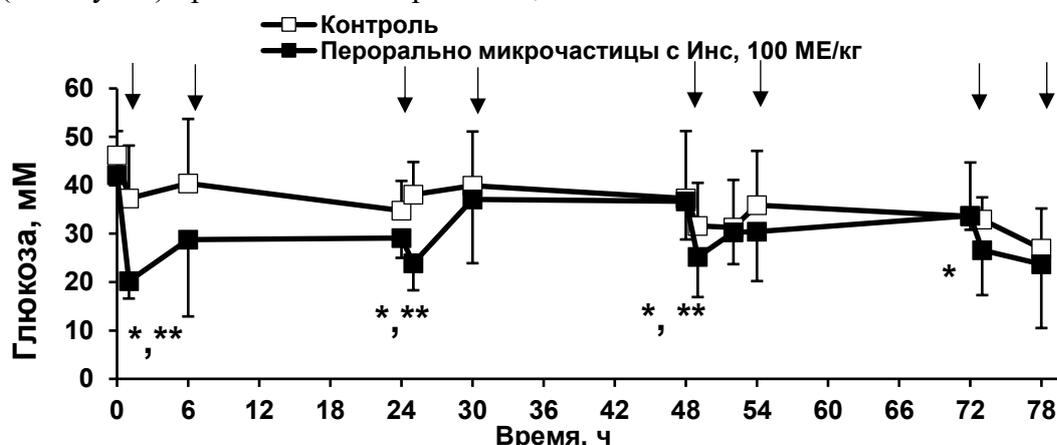


Рис. 3.32. Изменение содержания глюкозы в крови крыс с диабетом в условиях кормления *ad libitum* во время хронического эксперимента (6 - 9 сутки) при двукратном ежесуточном пероральном введении микрокапсулированного инсулина в дозе 100 МЕ/кг (опытная группа, n=7) или раствора 0,15 М NaCl, рН 3,0 (контрольная группа, n=6). Первое введение инсулина соответствовало 0, 24, 48, 72 ч, второе введение инсулина проводили через 6 ч после первого введения и измерения концентрации глюкозы (показано стрелкой).

* - через 1 ч после введения инсулина снижение уровня глюкозы достоверно ($p < 0,05$, критерий Уилкоксона); ** - через 1 ч после введения инсулина различие между группами достоверное ($p < 0,05$, критерий Манн-Уитни).

Снижение концентрации глюкозы через 1 ч после введения микрокапсул было значительным ($p < 0,05$, критерий Вилкоксона) в течение четырех суток наблюдения. Абсолютные значения концентрации глюкозы в крови животных опытной группы в первые два дня были достоверно ниже, чем в контрольной группе ($p < 0,05$, критерий Манна - Уитни).

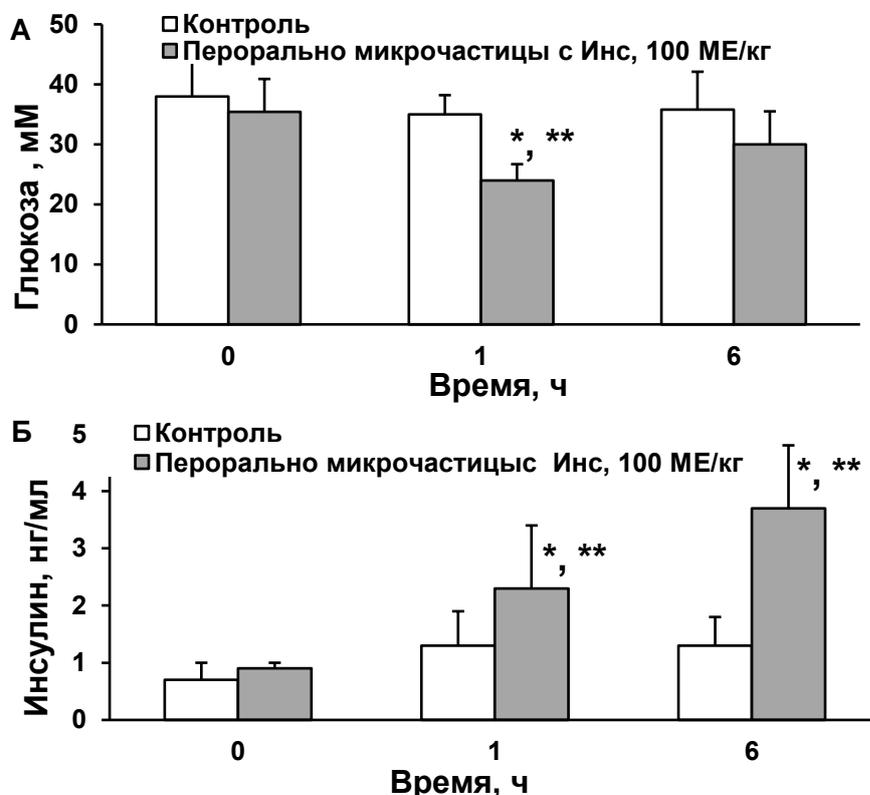


Рис. 3.33. Содержание глюкозы в крови (А) и инсулина человека в плазме крови (Б) крыс с диабетом в условиях кормления *ad libitum* во время хронического эксперимента (6 - 9 сутки) до (точка «0») и через 1 и 6 ч после перорального введения микрокапсулированного инсулина в дозе 100 МЕ/кг (опытная группа, $n=7$) или раствора 0,15 М NaCl, pH 3,0 (контрольная группа, $n=6$).

*- через 1 час после введения инсулина снижение уровня глюкозы достоверно относительно точки «0» ($p < 0,05$, критерий Уилкоксона); **- через 1 час после введения инсулина различие между группами достоверное ($p < 0,05$, критерий Манн-Уитни).

Для подтверждения попадания инсулина в кровь животных анализировали концентрацию гормона с помощью иммуноанализа (рис. 3.33 Б). Значительные изменения концентрации инсулина в плазме относительно исходного уровня наблюдали только в опытной группе. Через 1 и 6 ч после введения микрокапсул концентрация инсулина человека была выше исходного уровня и выше, чем в контрольной группе животных.

При определении дозозависимости гипогликемический эффект инсулина выражали как отношение концентрации глюкозы в крови через 1 ч после введения препарата к исходной концентрации глюкозы до введения (рис. 3.34). Эффект перорального введения

микрокапсулированного инсулина возрастал с увеличением дозы и в наибольшей степени проявлялся при дозе препарата 100 МЕ/кг.

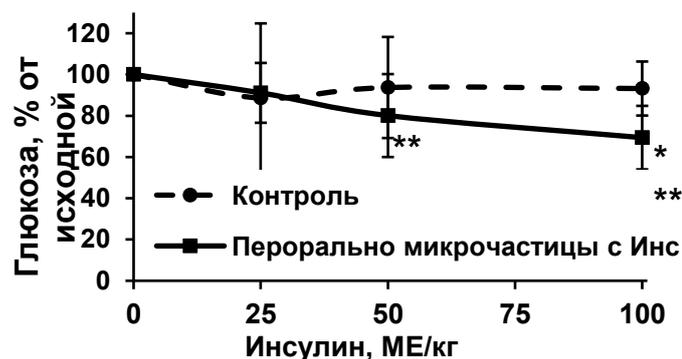


Рис. 3.34. Относительное изменение содержания глюкозы в крови крыс с диабетом в условиях кормления *ad libitum* через 1 ч после перорального введения различных доз микрокапсулированного инсулина (опытная группа, $n=7$) или раствора 0,15 М NaCl, pH 3,0 (контрольная группа, $n=6$) по данным трехсуточного эксперимента.

* - достоверное различие между группами, $p < 0,05$, критерий Манна-Уитни; ** - достоверное отличие от исходного значения, $p < 0,05$, критерий Уилкоксона.

Дополнительно в хроническом эксперименте был изучен эффект совместного микрокапсулирования инсулина и ингибитора Баумана-Бирк при соотношении Инс : ИББ равном 20 : 1. Препараты микрочастиц (Инс-ДС)-Хит-ДС-Хит и микрочастиц (Инс/ИББ-ДС)-Хит-ДС-Хит, содержащих $2,7 \pm 0,3$ % ингибитора протеаз, вводили животным перорально однократно в дозе 100 МЕ/кг. Концентрация глюкозы в крови животных по сравнению с исходным уровнем глюкозы снизилась через 1 ч на $31 \pm 4\%$ после приема частиц без ингибитора и на $38 \pm 5\%$ после приема микрочастиц с ингибитором ($p < 0,05$). Можно предположить, что дополнительный эффект снижения концентрации глюкозы на 7 % был обусловлен наличием в микрочастицах белкового ингибитора протеаз.

3.1.6. Выводы к разделу 3.1.

1. Разработаны методы получения наноструктурированных микроматриц с использованием высаливания и образования нерастворимого комплекса белка с полинионом, характеризующихся высокими содержанием белка и пригодных для послойной адсорбции полиэлектролитов. Метод высаливания применим для ограниченного круга белков и осуществляется при высокой ионной силе растворов. Нерастворимые полиэлектролитные комплексы белка могут быть сформированы при 0,15 М NaCl в кислых средах для широкого круга белков и включать одновременно несколько белков.
2. На разработанных белоксодержащих матрицах путем послойной адсорбции полианионов (декстрансульфата, хитозансульфата, альгината) и поликатионов (хитозана, протамина) получены

микрочастицы со средним размером 3 - 30 мкм, повторяющие форму и размер матриц и являющиеся наноструктурированными, включая первичные образования размером 100 - 200 нм. Обработка ультразвуком позволила измельчить частицы до размера 1 - 3 мкм, а в случае использования в качестве поликатиона протамина до размера 100 - 200 нм. Микрочастицы стабильны при хранении в суспензии и после лиофильной сушки, характеризуются высокими эффективностью включения, содержанием и биологической активностью белковых препаратов, рН чувствительными свойствами, зависящими от изоэлектрической точки белка, природы, плотности заряда и молекулярной массы биополимеров, рН-формирования и числа полиэлектролитных слоев.

3. Универсальность предложенного подхода микрокапсулирования послойной адсорбцией полиэлектролитов на нерастворимых полиэлектролитных комплексах была продемонстрирована для широкого круга белков и ферментов с различными физико-химическими свойствами.

4. На примере мультислойных микрочастиц, сформированных послойной адсорбцией высокомолекулярных декстрансульфата и хитозана на нерастворимых полиэлектролитных комплексах инсулина, выявлены многофункциональные свойства (рН-чувствительность, пролонгированное высвобождение белка, мукоадгезивность, связывание ионов кальция, защита от агрессивных сред и протеолиза), обеспечивающие повышение биодоступности микрокапсулированных белков при мукозальной доставке.

5. Разработана стратегия выбора белковых ингибиторов протеаз для защиты микрокапсулированного целевого белка от протеолиза. Наличие в микрочастицах 2 - 3 % ингибитора типа Баумана-Бирк полностью предотвращало деградацию инсулина человека протеазами тонкого кишечника человека и значительно ослабляло деградацию быстродействующих мономерных инсулинов аспарт и лизпро.

6. Предложен общий принцип действия контейнеров в виде мультислойных частиц с белками при мукозальном, в том числе пероральном применении.

7. В экспериментах *in vivo* подтверждено сохранение активности инсулина при его включении в мультислойные микрочастицы из декстрансульфата и хитозана. Гипогликемическое действие микрокапсулированного инсулина и растворенного инсулина при подкожном введении здоровым кроликам в дозе 4 МЕ/кг совпадало. Однократное пероральное введение микрокапсулированного инсулина в низких дозах (10 и 25 МЕ/кг) крысам с диабетом натошак вызывало пролонгированный гипогликемический эффект. В хроническом эксперименте при двукратном ежедневном пероральном введении микрокапсулированного инсулина в дозе 100 Ед/кг диабетическим крысам, имеющим постоянный доступ к еде, в крови животных наблюдали снижение концентрации глюкозы через 1 ч и увеличение содержания инсулина человека через 1 и 6 ч после приема препарата.

3.2. Микрокапсулирование белков в полиэлектролитные микрокапсулы, полученные на основе растворимых матриц

При определенных требованиях к доставке белков (например при интраназальном применении) или для аналитических целей важна однородность формы и узкое распределение микрочастиц по размеру, поэтому в разделе 2 проведено сравнение иммобилизации белков в матриксные и полые микрокапсулы, полученные послойной адсорбцией декстрансульфата 500 кДа и протамина на обладающих высокой монодисперсностью растворимых матрицах в виде меламинаформальдегидных ядер или микросфер ватерита соответственно (рис. 3.35).

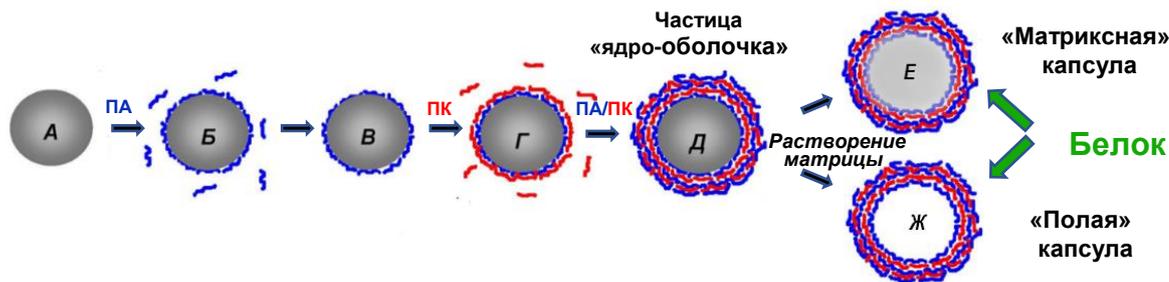


Рис. 3.35. Схема включения белка в готовые матриксные (Е) и полые (Ж) микрокапсулы, полученные послойной адсорбцией полиэлектролитов (Б - Д) на меламинаформальдегидных ядрах и микросферах ватерита соответственно (А).

3.2.1. Получение и характеристика мультислойных микрокапсул, полученных на растворимых матрицах

Меламинаформальдегидные микросферы сферы (МФ-ядра) с узким распределением по размеру были одними из первых матриц, использовавшихся для послойной адсорбции полиэлектролитов. Меламинаформальдегидная смола представляет собой сложное соединение, содержащее эфирные связи, первичные, вторичные и третичные аминогруппы, метиленовые мостики, гидроксильные группы (рис. 3.36). При быстром подкислении (жесткие условия) и при медленном подкислении (мягкие условия) МФ-ядра полностью растворяются.

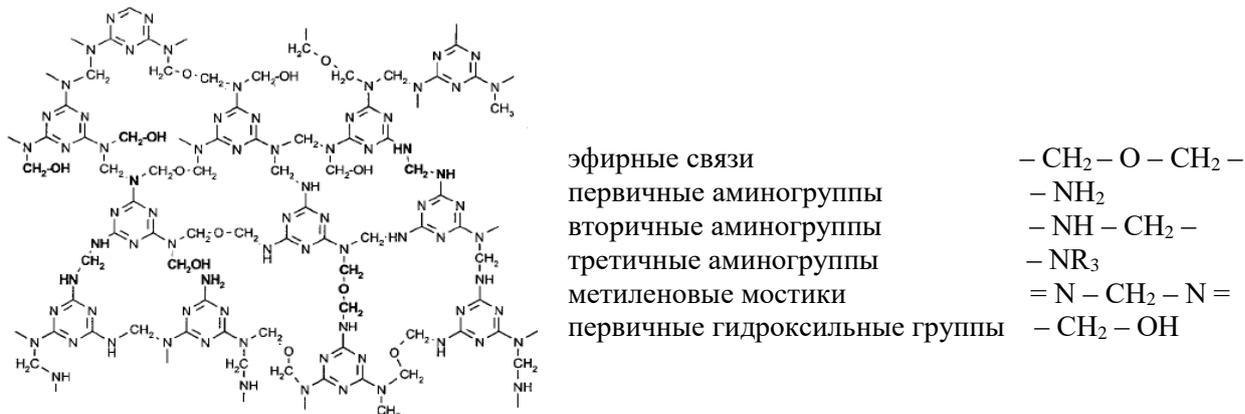


Рис. 3.36. Схематическое изображение меламинаформальдегидной смолы и типичных структурных единиц.

Продукты гидролиза меламинаформальдегида и выбранные полиэлектролиты не оказывали влияние на активность большинства ферментов (табл. 3.18).

Таблица 3.18. Сохранение активности пероксидазы в присутствии компонентов, использованных для микрокапсулирования, и после иммобилизации в микрокапсулы МФ(ДС-Пр)₄ (0,1 М ацетатный буфер, рН 5,0, массовое соотношение компонент : фермент 100 : 1)

Время, ч	Сохранение удельной активности пероксидазы, %				
	Фермент в растворе				Фермент в МФ(ДС-Пр) ₄
	буфер	декстрансульфат	протамин	гидролизат МФ	
1	100±4	101±5	124±6	124±4	57±3
96	85±4	95±4	102±5	104±4	55±2
168	83±4	91±4	98±5	89±3	53±2

Полиэлектролитные частицы были получены на МФ-ядрах диаметром $5,12 \pm 0,15$ мкм послойной адсорбцией четырех бислоев декстрансульфата и протамина в 0,2 М NaCl при рН 5 (рис. 3.35). При последующем быстром растворении МФ-ядер такие частицы полностью разрушались, в то время как при использовании синтетических полиэлектролитов ПСС и ПАА, образующих более прочный полиэлектролитный комплекс, были сформированы «полые» микрокапсулы. Стабильные микрокапсулы с использованием декстрансульфата и протамина, обозначенные как МФ(ДС-Пр)₄, удалось получить только при растворении МФ-ядер в мягких условиях при медленном понижении рН до 1,7 (рис. 3.37).

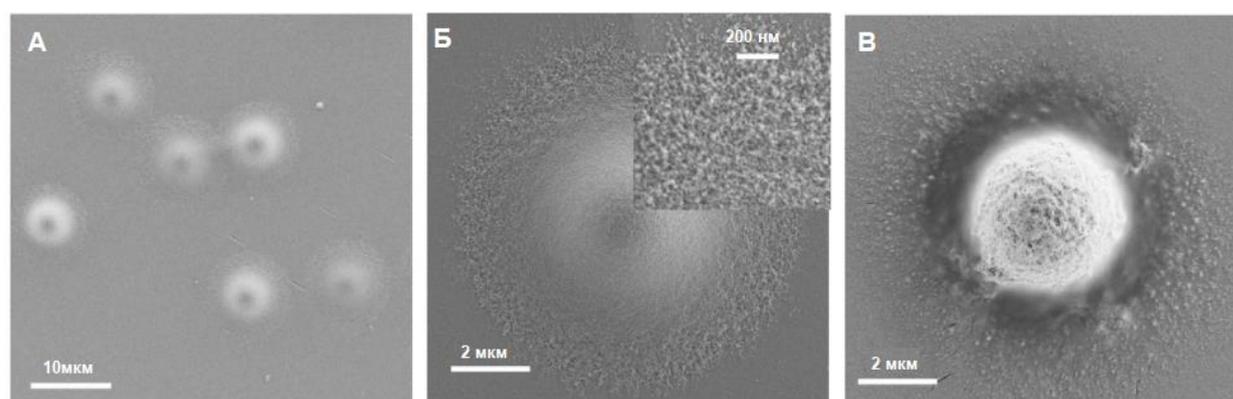


Рис. 3.37. СЭМ фотографии микрокапсул МФ(ДС-Пр)₄ до (А, Б) и после (В) включения каталазы.

Однако растворение МФ-смолы в мягких условиях в присутствии полиэлектролитов может сопровождаться конкурирующим процессом реполимеризации с образованием нерастворимых продуктов [358]. Микрокапсулы МФ(ДС-Пр)₄ были однородными по размеру, а их диаметр составлял $8,0 \pm 0,2$ мкм при рН 3 - 5 и $9 - 10$ мкм при рН 7 - 8, что больше диаметра исходных МФ-

ядер. Увеличение размеров микрокапсул было вызвано значительным увеличением осмотического давления при гидролизе меламинаформальдегидной смолы [359]. По данным СЭМ микрокапсулы имели рыхлую оболочку и выпуклую центральную часть (рис. 3.37 А, Б). Для изучения состава микрокапсул была использована Рамановская спектроскопия (рис. 3.38).

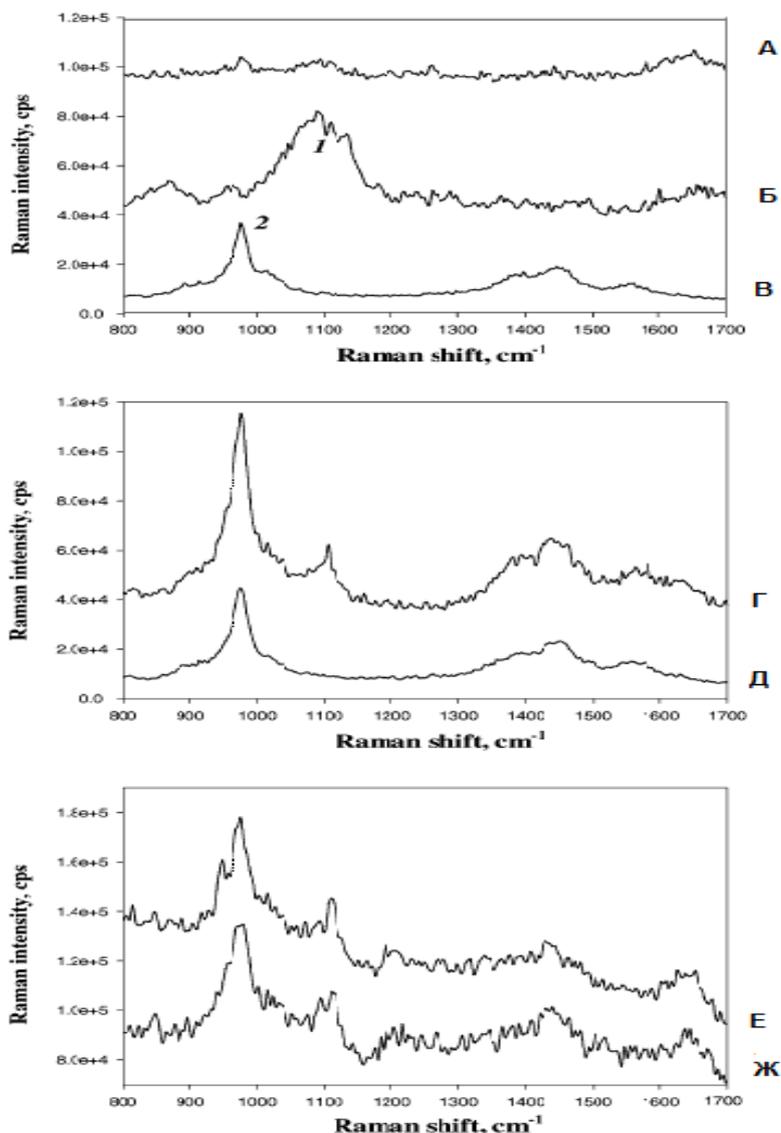


Рис. 3.38. Рамановские спектры протамина (А), декстрансульфата (Б), меламинаформальдегидного ядра (В), оболочки (Г) и центра (Д) МФ-ядер, покрытых (ДС-Пр)₄, оболочки (Е) и центра (Ж) матричных микрокапсул МФ(ДС-Пр)₄. 1 - типичные пики сульфатных групп, 2 - типичные пики меламина.

Сравнение спектров протамина, декстрансульфата (пик 1100 см⁻¹, типичный для сульфатных группы (1)) и меламинаформальдегида (пик 977 см⁻¹, типичный для меламина и меламинаформальдегидной смолы (2)) выявило наличие полианиона и меламинаформальдегида, как в полиэлектролитной оболочке нерастворенных МФ-ядер (Г), так в оболочке (Е) и в центральной части (Д) микрокапсул МФ(ДС-Пр)₄ после разрушения ядер. При медленном растворении МФ-ядер при рН 1,7 декстрансульфат из полиэлектролитной оболочки

взаимодействовал с положительно заряженными продуктами деградации меламинаформальдегида, что вызывало перераспределение полимеров и образования слабо сшитой гелеобразной матрицы на основе комплекса олигомеров меламинаформальдегида с полиэлектролитами из оболочки, что подтверждалось данными других авторов [360].

Для дополнительного выяснения внутреннего строения микрокапсул был предложен подход с использованием сорбции флуоресцентных низкомолекулярных красителей различного заряда (рис. 3.39) и белков, меченных такими красителями.

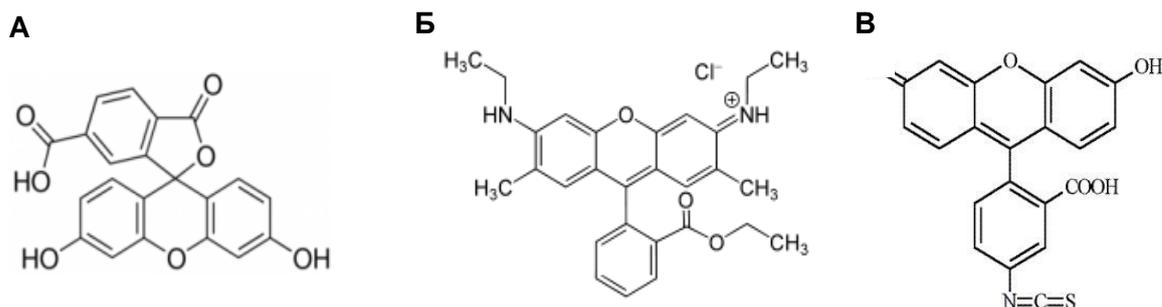


Рис. 3.39. Структурные формулы 6-карбоксифлуоресцеина (А), родамина 6G (Б) и флуоресцеинизотиоцианата (В).

По данным КЛСМ отрицательно заряженный 6-карбоксифлуоресцеин (376 кДа) и положительно заряженный родамин (479 кДа) проникали и равномерно распределялись внутри частиц при pH 5 - 8 (рис. 3.40 Б - Г). Связывание противоположно заряженных красителей подтверждало наличие внутри капсулы однородной матрицы с положительно и отрицательно заряженными группами. ФИТЦ ковалентно связывался как с (ДС-Пр)₄-оболочкой, покрывающей нерастворенные МФ-ядра (рис. 3.41 А), так с оболочкой и внутренним содержимым микрокапсул МФ(ДС-Пр)₄ (рис. 3.41 Б), что демонстрировало наличие свободных аминогрупп в мультислойной оболочке и внутри частиц. Аналогично низкомолекулярным красителям пероксидаза (44 кДа, pI 8,8), меченная ФИТЦ (рис. 3.40 Д, Е), и высокомолекулярная каталаза (250 кДа, pI 5,4), меченная родамином (рис. 3.42 Б), проникали и концентрировалась при pH 4 - 8 внутри микрокапсул МФ(ДС-Пр)₄.

Предложенный комплексный подход с проведением исследований с использованием Рамановской спектроскопии и КЛСМ визуализации распределения красителей и ферментов в частицах позволил назвать полученные микрокапсулы МФ(ДС-Пр)₄ «матриксными». Наличие внутри матриксных микрокапсул остатков меламинаформальдегида не позволяет их использовать в качестве систем доставки белковых препаратов, но представляет интерес для иммобилизации ферментов в аналитических целях.

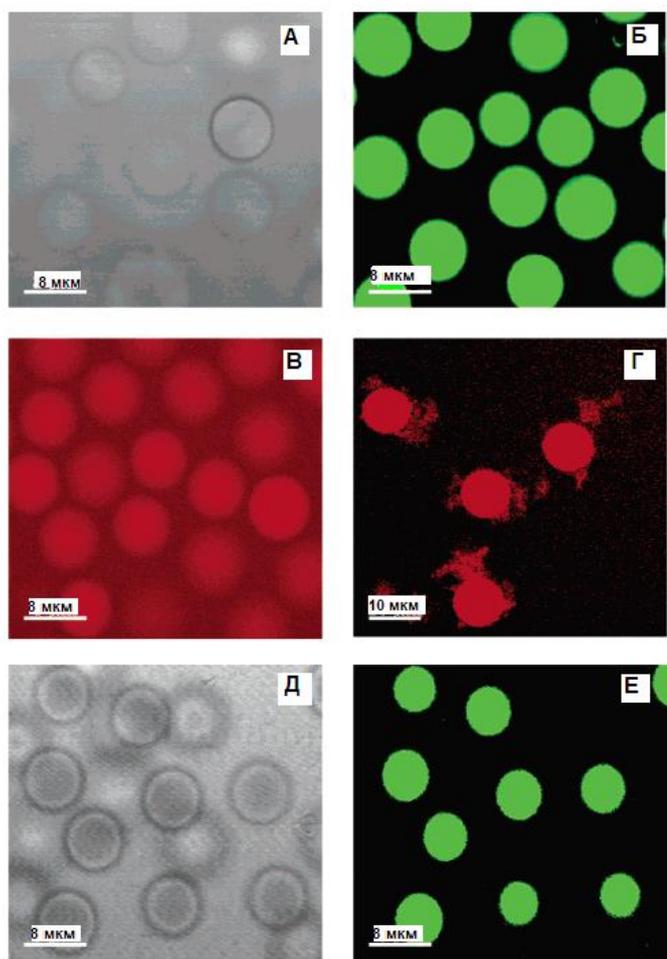


Рис. 3.40. КЛСМ фотографии матричных микрокапсул МФ(ДС-Пр)₄: при рН 5 - А (трансмиссия) и Б (флуоресценция) при сорбции 6-карбоксифлуоресцеина, В (флуоресценция) при сорбции родамина, Д (трансмиссия) и Е (флуоресценция) при сорбции пероксидазы-ФИТЦ; при рН 9 - Г (флуоресценция) при сорбции родамина.

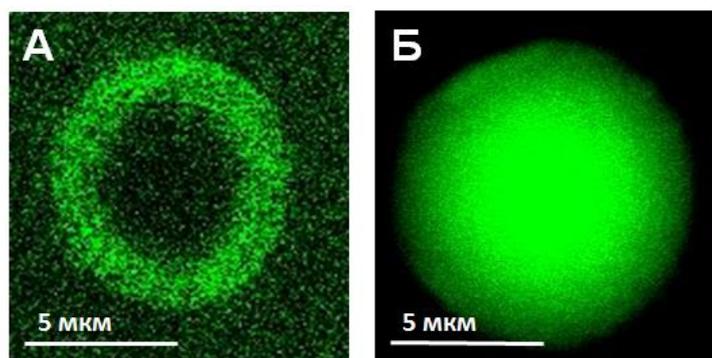


Рис. 3.41. КЛСМ фотографии связывания флуоресцеинизотиоцианата с МФ-ядром, покрытым оболочкой (А), и матричными микрокапсулами МФ(ДС-Пр)₄ (Б).

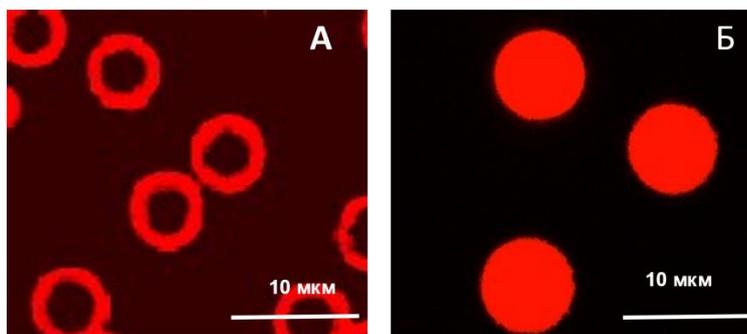


Рис. 3.42. КЛСМ фотографии связывания каталазы, меченной родамин В, (рН 7,0) с МФ-ядрами, покрытыми оболочками (ДС-Пр)₄ (А), и матричными микрокапсулами МФ(ДС-Пр)₄(Б).

Стабильные полые микрокапсулы (ДС-Пр)₂ДС были получены на микросферах ватерита (далее микросферы СС) с диаметром 5 ± 1 мкм (рис. 3.43), площадью поверхности $10,4 \pm 0,3$ м²/г, средним размером пор 10 - 20 нм (рис. 3.44) и поверхностным зарядом 0 - 13 мВ путем послойной адсорбции декстрансульфата 500 кДа и протамина в растворе 0,15 М NaCl с рН 8 с последующим растворением карбонатной матрицы эквимольным количеством ЭДТА.

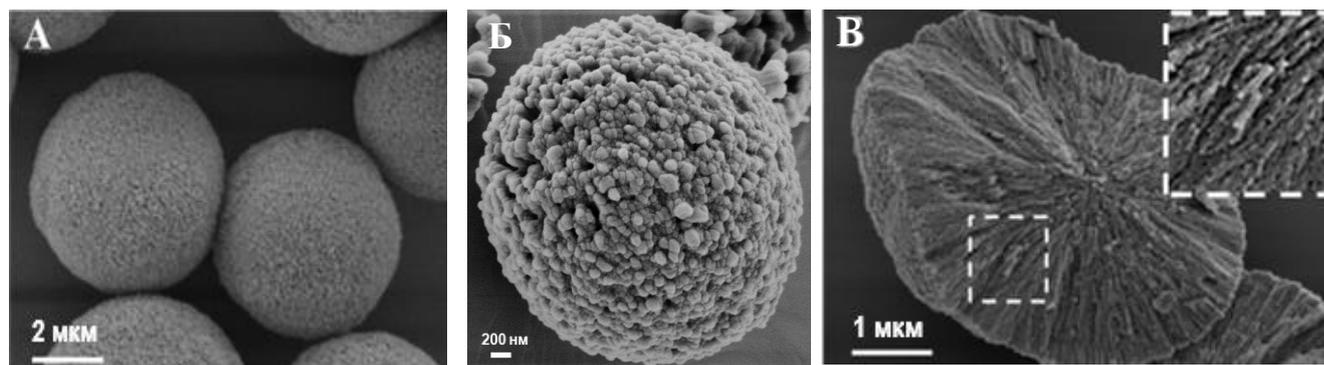


Рис. 3.43. СЭМ фотографии микросфер ватерита (А, Б) и расколотой частицы (В). На вставке увеличение в 2 раза.

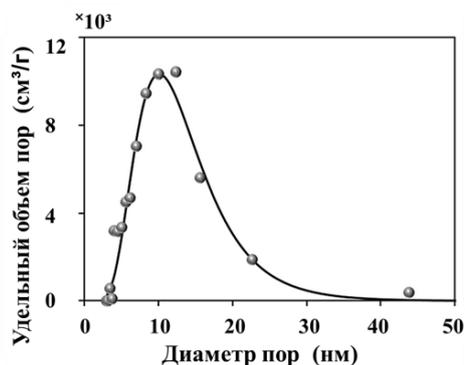


Рис. 3.44. Распределение пор микросфер ватерита по размерам (метод БЭТ, модель Barret-Joyner-Halenda).

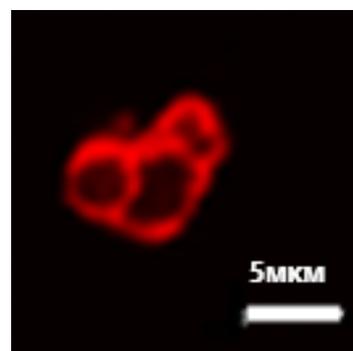


Рис. 3.45. КЛСМ фотография полых микрокапсул (ДС-Пр)₂ДС после включения родамина 6G.

Использование на первой стадии сорбции высокомолекулярного декстрансульфата, который согласно [361] не проникает в поры микросфер ватерита, приводило к образованию полых микрокапсул, что подтверждалось включением флуоресцентных красителей только в полиэлектролитные стенки частиц (рис. 3.45).

3.2.2. Особенности включения белков в готовые мультислойные микрокапсулы

Проведено сравнение включения белков с различными физико-химическими свойствами в готовые мультислойные матричные и полые микрокапсулы.

Для матричных микрокапсул МФ(ДС-Пр)₄ изучено влияние рН на сорбцию низкомолекулярных белков и ферментов, относящихся к классу оксидоредуктаз (рис. 3.46).

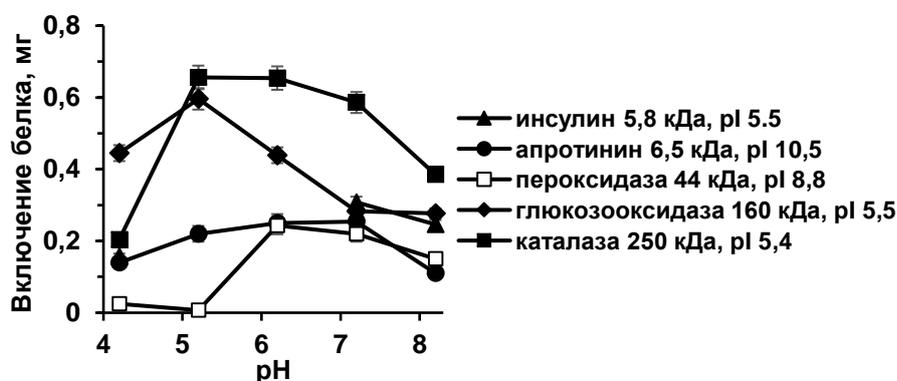


Рис. 3.46. Влияние рН на сорбцию белков в матричные микрокапсулы МФ(ДС-Пр)₄ ($3,5 \cdot 10^7$ частиц, 2 мг белка). Для инсулина в связи с плохой растворимостью вблизи pI 5,5 данные включения при рН 5 - 6 не приведены.

Изменение рН влияло как на заряд белковых молекул, так и на структуру матричных капсул. Максимальное количество белка загружалось при рН близком к изоэлектрической точке. Связывание белков с высоким pI было значительно меньше, чем белков с низким pI. При низких значениях рН снижение количества сорбированных белков происходило за счет уменьшения объема микрокапсул, о чем упоминалось выше. Уменьшение количества связавшегося белка при увеличении рН выше нейтральных значений было обусловлено изменением самих микрокапсул: с реорганизацией структуры полиэлектролитной оболочки, вызванной уменьшением заряда на протамине при приближении к его pI 10,5, и с переменной суммарного заряда внутри частиц вследствие частичного депротонирования аминогрупп матрицы. По данным СЭМ (рис. 3.37 В) при максимальном включении каталазы, когда концентрация белка внутри микрокапсул достигала 219 ± 7 мг/мл, изменялась структура частицы, а ее центральная часть становилась еще более выпуклой.

С уменьшением концентрации белка при сорбции в матричные капсулы наблюдалось увеличение эффективности включения белка и удельной активности иммобилизованного

фермента (табл. 3.19). Концентрация каталазы внутри микрокапсул более чем на два порядка превышала концентрацию белка в исходном растворе фермента.

Таблица 3.19. Сорбция каталазы в матриксные микрокапсулы при pH 7,0 ($1,4 \cdot 10^7$ частиц/мл)

Концентрация каталазы, мг/мл	Эффективность включения белка, %	Сохранение удельной активности иммобилизованной каталазы, %	Концентрация белка в капсуле, мг/мл
0,89	68 ± 3	13 ± 1	83 ± 5
0,17	99 ± 1	29 ± 3	24 ± 1
0,08	100 ± 6	72 ± 4	15 ± 1

Для протекания ферментативной реакции внутри частиц необходимо, чтобы субстрат проникал через оболочку внутрь микрокапсул, а продукт реакции выходил в окружающий раствор. С увеличением концентрации фермента в микрокапсуле увеличивается влияние диффузионных факторов. При этом реальная скорость ферментативной реакции может оказаться меньше потенциально возможной, так как в результате диффузионного торможения, создаваемого матриксной микрокапсулой, почти весь субстрат будет расщепляться приповерхностными слоями фермента, а глубинные области микросфер будут обеднены субстратом [362]. Увеличение удельной активности фермента при уменьшении количества белка внутри микрокапсул, по-видимому, связано с переводом реакции из диффузионного режима в кинетический. При хранении микрокапсул активность микрокапсулированной каталазы снижалась за 30 суток на 4 %, тогда как потеря активности фермента в растворе составляла 20 %.

Для установления природы сил, отвечающих за взаимодействия белка с матриксными микрокапсулами, было изучено влияние температуры, гидрофобности среды и ионной силы на сорбцию каталазы (рис. 3.47). Следует заметить, что микроскопическое исследование не выявило никаких изменений размера, формы микрокапсул и распределения белка внутри частиц при варьировании параметров в выбранных интервалах.

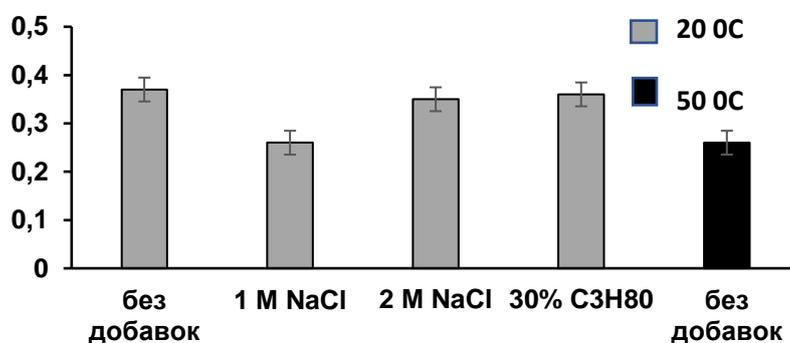


Рис. 3.47. Влияние температуры, ионной силы и полярности среды на сорбцию каталазы в микрокапсулы МФ(ДС-Пр)₄. Условия: $3,5 \cdot 10^6$ частиц/мл, 0,9 мг/мл каталазы, pH 7,0.

Повышение температуры от 20 до 50 °С приводило к уменьшению количества каталазы в микросферах на 30 %. Рост температуры вызывает ослабление всех видов межмолекулярных взаимодействий (особенно электростатических) за исключением гидрофобных [363]. При увеличении температуры образование гидрофобных связей термодинамически более выгодно, так как основной вклад в эти взаимодействия вносит энтропийная составляющая, линейно уменьшающаяся с ростом температуры [363], поэтому можно предположить, что электростатические взаимодействия играют существенную роль в процессе включения белка в микрочастицы. Увеличение ионной силы среды способствует ослаблению электростатических взаимодействий и усилению гидрофобных [363, 364]. При увеличении концентрации NaCl до 1 М количество сорбированной каталазы уменьшалось на 30 % по сравнению с буферным раствором. Однако небольшие добавки соли до 1 М мало влияют на гидрофобные взаимодействия в дисперсных системах [364], поэтому уменьшение количества каталазы, сорбированной в микрокапсулы МФ(ДС-Пр)₄, в растворе с указанной ионной силой, может быть вызвано уменьшением электростатических взаимодействий. При дальнейшем возрастании концентрации NaCl до 2 М микрокапсулы сильно агрегировали, а количество каталазы в микросферах возрастало по сравнению с аналогичным экспериментом с 1 М NaCl на 24 % (и было лишь на 6 % меньше, чем при включении фермента в буферном растворе). Эти данные свидетельствовали о наличии гидрофобных взаимодействий (как в процессе включения белка, так и при агрегировании микросфер), вклад которых стал превышать уменьшение электростатических взаимодействий между каталазой и микрокапсулами. Уменьшение полярности среды приводит к усилению электростатических и ослаблению гидрофобных взаимодействий из-за нарушения структуры воды [363]. Введение в среду 30 %-ного изопропанола практически не изменяло включения каталазы в микросферы, что указывало на вклад как электростатических, так и гидрофобных взаимодействий в удерживании каталазы внутри микросфер, так как, по-видимому, их возрастание и уменьшение соответственно были скомпенсированы.

Анализ удерживания в микрокапсулах белков при смене раствора, из которого они сорбировались, на буфер с тем же значением рН, выявил, что с увеличением молекулярной массы скорость выделения белков снижалась, а для высокомолекулярных была незначительной (рис. 3.48). По-видимому, для высокомолекулярных белков в течение первого часа высвобождались молекулы, слабо связанные в приповерхностных слоях микрокапсул, а далее этот процесс значительно замедлялся. Для пероксидазы, сорбированной в частицы при рН 8,0, наблюдалось увеличение высвобождения с уменьшением рН от 8 до 4 (рис. 3.49) и при возрастании концентрации NaCl до 1 М.

Таким образом, изменение рН и ионной силы могут регулировать высвобождение белков из матричных микрокапсул МФ(ДС-Пр)₄.

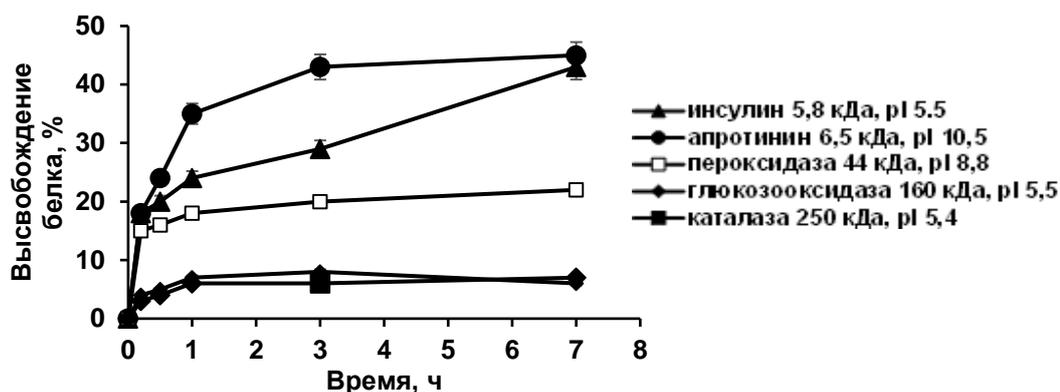


Рис. 3.48. Кинетика высвобождения сорбированных белков из матричных микрокапсул МФ(ДС-Пр)₄, рН 7,0 ($1,75 \cdot 10^7$ частиц/мл).

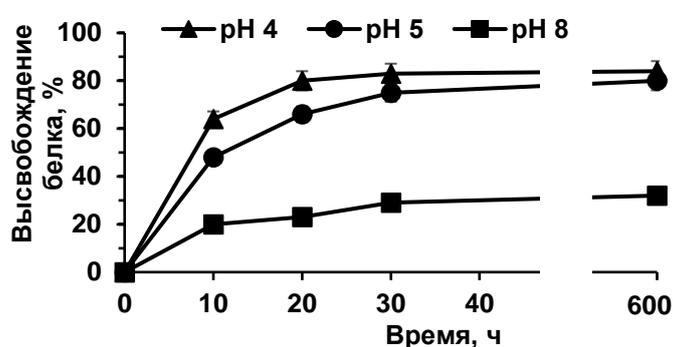


Рис. 3.49 Влияние pH на высвобождение из матричных микрокапсул МФ(ДС-Пр)₄ пероксидазы, сорбированной при pH 8,0 ($1,75 \cdot 10^7$ частиц/мл).

Предложенный метод получения матричных микрокапсул послужил основой создания Ye S. и др. [365] похожих частиц на МФ-ядрах путем послойной адсорбции альгината/хитозана и последующего мягкого гидролиза матрицы. Однако, сорбция инсулина в такие матричные микрокапсулы, имеющие внутри отрицательно заряженную матрицу, была в 100 раз ниже.

Для полых микрокапсул (ДС-Пр)₂ДС с отрицательно заряженной поверхностью исследовали сорбцию высокомолекулярной каталазы и низкомолекулярного апротинина при pH 5 и 7 (табл. 3.20).

Таблица 3.20. Влияние pH на включение белка в готовые полые микрокапсулы (ДС-Пр)₂ДС

Белок	pI	pH	Содержание белка, мг/г частиц	Сохранение удельной активности иммобилизованного белка, %
Каталаза	5,4	5,0	420±31	56±7
		7,0	70±10	99±12
Апротинин	10,5	5,0	240±15	100±13
		7,0	210±17	96±4

pH среды мало влияло на содержание и высокое сохранение удельной ингибирующей активности положительно заряженного аprotинина. Содержание в капсулах каталазы, сорбированной при pH 5 близком к изоэлектрической точке фермента, было существенно выше, чем при pH 7, когда белок был заряжен отрицательно. Однако сохранение удельной активности фермента, иммобилизованного в меньших количествах при pH 7, было более высоким. Для полых микрокапсул, аналогично матричным, с уменьшением концентрации белка происходило увеличение удельной активности иммобилизованных ферментов. По данным КЛМС белки включались только в стенки полых мультислойных микрокапсул.

3.2.3. Функционирование биферментных систем в мультислойных микрокапсулах

Включение белков в готовые мультислойные капсулы позволяет одновременно иммобилизовать несколько ферментов. Сорбция в готовые микрокапсулы биферментных систем глюкозооксидазы/пероксидазы и глюкозооксидазы/каталаза была изучена на матричных микрокапсулах МФ(ДС/ПР)₄, характеризовавшихся высоким включением (рис. 3.46) и малым высвобождением (рис. 3.48) отдельных оксидоредуктаз. С использованием КЛМС, на примере одновременного включения глюкозооксидазы и пероксидазы, показано равномерное распределение внутри микрокапсулы пероксидазы, меченной ФИТЦ, и глюкозооксидазы, меченной родамином 6G (рис. 3.50).

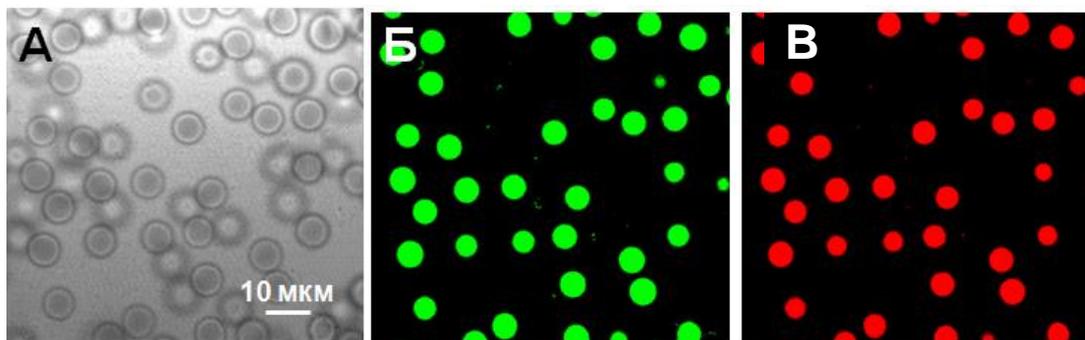


Рис. 3.50. КЛМС фотографии матричных микрокапсул МФ(ДС-ПР)₄ после последовательного включения пероксидазы, меченной ФИТЦ, и глюкозооксидазы, меченной родамином: А - трансмиссия; Б - В - флуоресценция пероксидазы-ФИТЦ (Б) и глюкозооксидазы-родамин (С).

Эффективности включения ферментов при совместной загрузке были ниже, чем при индивидуальной (табл. 3.21). По-видимому, высокомолекулярные ферменты с большей молекулярной массой вытесняли ферменты с меньшей молекулярной массой. Удельная активность ферментов при совместной загрузке уменьшалась на 10 - 14 % по сравнению с индивидуальной сорбцией.

Таблица 3.21. Характеристика включения оксидоредуктаз в матричные микрокапсулы МФ(ДС-Пр)₄ (1,4·10⁷ частиц/мл)

Способ включения	Фермент	Исходная концентрация белка, мг/мл	Эффективность включения белка, %	Сохранение удельной активности иммобилизованного фермента, %
Индивидуальное включение	пероксидаза	0,0625	96±3	54 ± 3
	каталаза	0,21	100±2	26 ± 1
	глюкозооксидаза	0,16	100±3	86±1
		0,50	74±3	41±2
Совместное включение	каталаза	0,21	90 ± 3	21 ± 1
	глюкозооксидаза	0,16	56 ± 2	68 ± 2
	пероксидаза	0,0625	80 ± 3	40 ± 2
	глюкозооксидаза	0,50	66 ± 2	29 ± 1

При хранении микрокапсул с биферментными системами при температуре 20 °С в течение 30 суток наблюдений высвобождение совместно иммобилизованных ферментов было незначительным, а их активность практически не изменялась, тогда как активность ферментов в растворе уменьшалась на 20 - 35 %.

Для подтверждения действия биферментных систем внутри микрокапсул использовали реагент Амплекс красный, из которого в присутствии образующегося пероксида водорода под действием пероксидазы образуется флуоресцирующий продукт резорурфин (рис. 3.51):

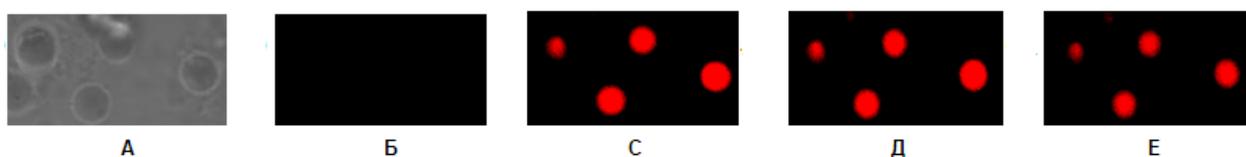
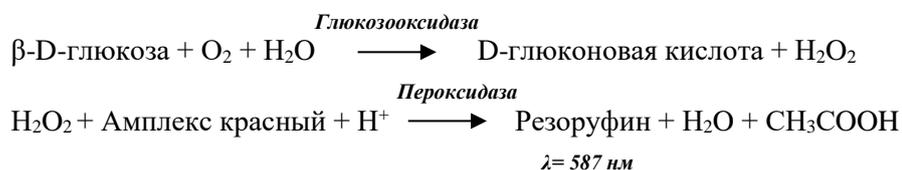


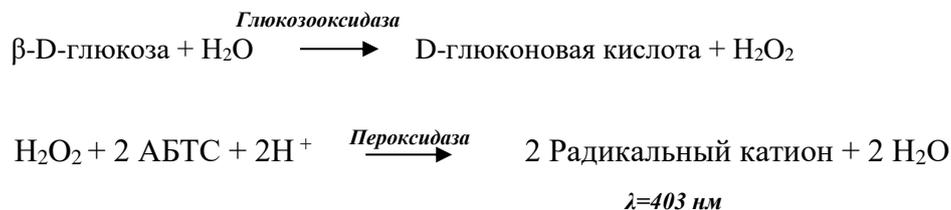
Рис. 3.51. КЛСМ фотографии микрокапсул МФ(ДС-Пр)₄ с совместно включенными глюкозооксидазой и пероксидазой в присутствии глюкозы и Амплекса красного: А) трансмиссия; Б - Е) флуоресценция через 1 (Б), 20 (В), 30 (Г) и 40 (Д) мин от начала реакции.

Количество глюкозы при окислении глюкозооксидазой было пропорционально количеству пероксида водорода и, следовательно, количеству резорурфина, образующегося из Амплекса красного в присутствии пероксидазы. Свечение резорурфина наблюдалось во всех капсулах, находящихся в поле зрения, в то время как в растворе флуоресценции продукта не наблюдалось. Предложенный метод конфокальной визуализации нахождения активной биферментной системы

внутри микрокапсул был позже успешно использован в работах других авторов, изучавших локализацию биферментных каталитических систем внутри полиэлектролитных частиц [366].

Функционирование иммобилизованных биферментных систем подтверждено при анализе концентрации глюкозы в растворах (рис. 3.52).

Для микрокапсул с глюкозооксидазой/пероксидазой был использован субстрат 2,2'-азино-бис (3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота) (АБТС):



В начальной фазе окисление глюкозы глюкозооксидазой ограничивает скорость последовательных реакций [367]. Из-за высокой константы Михаэлиса для глюкозооксидазы ($K_m=30\text{-}110 \text{ мМ}$) реакция соответствует псевдопервому порядку по отношению к глюкозе. При концентрации глюкозы от 1 до 20 мг скорость реакции была линейно пропорциональна концентрации глюкозы (рис. 3.52 А).

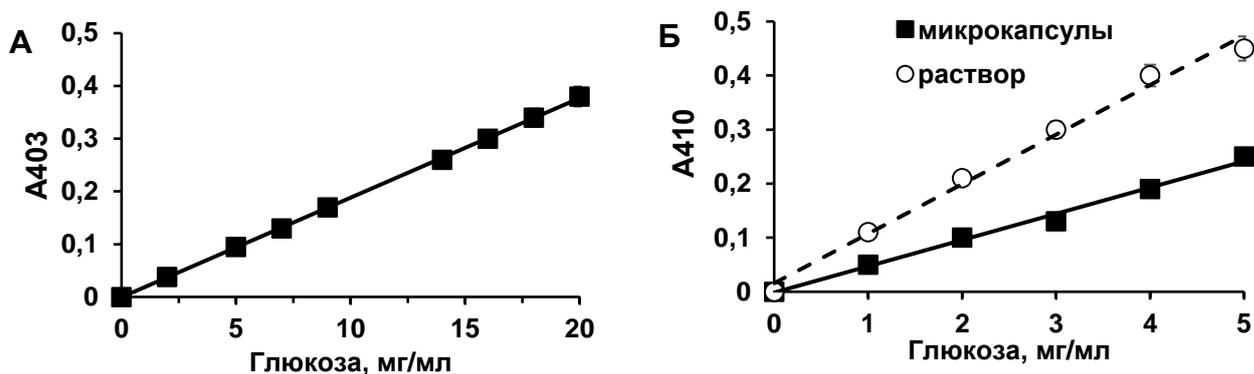
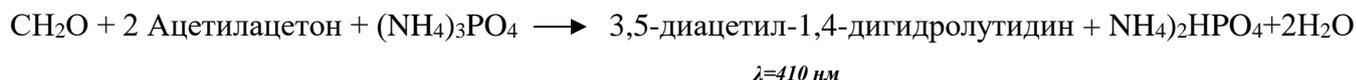
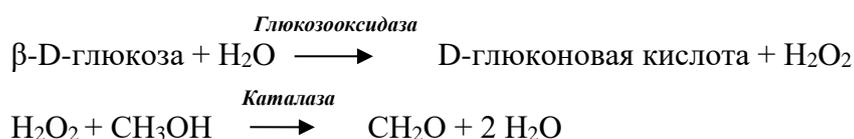


Рис. 3.52. Определение концентрации глюкозы с использованием биферментных систем глюкозооксидаза/пероксидаза (А) и глюкозооксидаза/каталаза (Б), иммобилизованных в матричные микрокапсулы МФ(ДС-Пр)₄ (А, Б), и в растворе (Б). Условия: $1,4 \cdot 10^5$ частиц/мл; А - 3,3 мкг/мл глюкозооксидазы, 0,5 мкг/мл пероксидазы, 150 мкг/мл АБТС, 2 мин; Б - 0,9 мкг/мл глюкозооксидазы, 1,9 мкг/мл каталазы, 0,02 М ацетилацетона, 0,12 М метанола, 1 ч.

Для микрокапсул с иммобилизованными глюкозооксидазой/каталазой для определения глюкозы использовали метанол и этилацетон:



Скорость биферментной реакции переходила в стационарный режим через 40 мин после начала реакции и становилась пропорциональной концентрации глюкозы. Получена градуировочная прямая (рис. 3.52 Б) для определения содержания глюкозы в концентрациях, наиболее часто встречающихся в биологических жидкостях (0 - 5 мг/мл). Время проведения реакции составило 1 ч.

Для оценки эффективности действия микрокапсулированной биферментной системы глюкозооксидаза/каталаза концентрация глюкозы была определена с помощью оксидоредуктаз, взятых в растворе в концентрациях аналогичных содержанию ферментов в частицах (рис. 3.52 Б). Более низкий наклон калибровочной прямой, полученной с использованием биферментной системы в растворе, подтверждал наличие диффузионных затруднений, приводящих к снижению скорости ферментативной реакции внутри микрокапсул. Микрокапсулы с биферментной системой глюкозооксидаза/каталаза были успешно использованы в 10 циклах анализа глюкозы без потерь активности ферментов.

Таким образом, микрокапсулирование белков в готовые мультислойные полиэлектролитные микрокапсулы определяется природой растворимой матрицы, что приводит к образованию матричных или полых капсул. Включение и удерживание белка в капсулах зависит от рН среды, молекулярной массы и изоэлектрической точки белка. Поскольку белки связывались с микрокапсулами благодаря ионным и гидрофобным силам их включение и высвобождение могут контролироваться изменением рН или ионной силы раствора. Высокомолекулярные белки прочно удерживались в микрокапсулах, когда рН их включения и последующего использования совпадали. С уменьшением содержания белка в мультислойных микрокапсулах увеличивалась удельная активность иммобилизованных ферментов. Данные об иммобилизации оксидоредуктазных биферментных системах в микрокапсулы свидетельствовали о перспективности подхода для создания микрокапсулированных мультиферментных каталитических систем.

3.2.4. Включение белков в мультислойные микрокапсулы путем предварительной загрузки в микросферы ватерита с помощью адсорбции и соосаждения

Использование мезопористых микросфер ватерита, состоящих из отдельных нанокристаллитов с диаметром около 100 нм (рис. 3.43 Б) и имеющих поры размером 10 - 20 нм (рис. 3.44), позволяло микрокапсулировать белки не только в готовые мультислойные микрокапсулы (рис. 3.53 путь 1), но и предварительно в матрицы до нанесения полиэлектролитных слоев с помощью адсорбции на их поверхности (рис. 3.53, путь 2) и осаждения в процессе формирования матриц (рис. 3.53, путь 3).

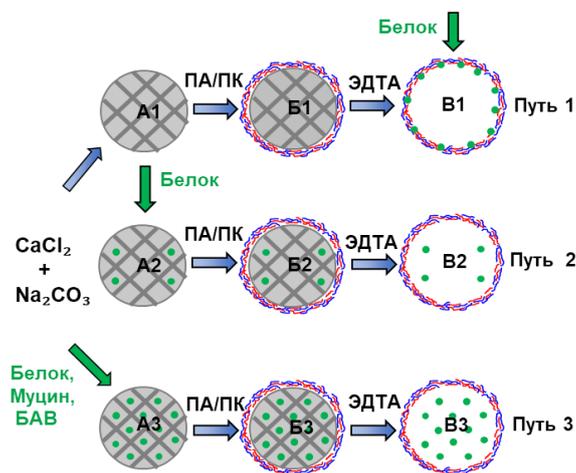


Рис. 3.53. Общая схема иммобилизации белка (и/или муцина и БАВ) с использованием послойной адсорбции полиэлектролитов на микросферах ватерита путем включения в готовые мультислойные капсулы (путь 1) или предварительно в матрицы с помощью адсорбции на поверхности (путь 2) или соосаждения (путь 3). А1 - сферы ватерита (СС); А2 - сферы ватерита с сорбированными белком (СС-Белок); А3 - сферы ватерита с соосажденными белком (ССБелок); Б (1 - 3) - сферы ватерита, покрытые полиэлектролитными оболочками; В (1 - 3) - мультислойные полые капсулы после растворения CaCO₃ с помощью ЭДТА

Следует заметить, что, несмотря на многочисленные публикации по капсулированию различных БАВ с использованием ватерита, в большинстве работ отсутствовало понимание причин большего включения белка при соосаждении и объективных данных сохранения активности капсулированных ферментов после нанесения полиэлектролитных слоев и растворения карбонатной матрицы. В этой связи предварительное включение белков в микросферы ватерита с помощью адсорбции и соосаждения было подробно исследовано.

При адсорбции на микросферах ватерита (рис. 3.53, А2) включение отрицательно заряженных в условиях эксперимента каталазы и инсулина были существенно выше, чем положительно заряженных низкомолекулярных протамин и апротинина (рис. 3.54, 3.55), что хорошо согласовывалось с данными других авторов [92, 368].

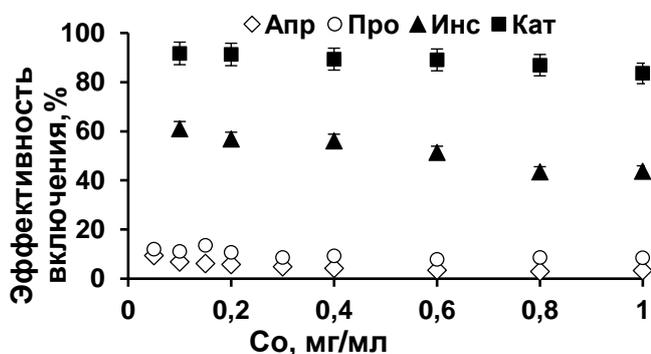


Рис. 3.54. Зависимость эффективности включения белка при адсорбции в микросферы ватерита. Условия: 40 мг/мл CaCO₃, 30 мин, рН 9,0, 25°С. C₀ - исходная концентрация белка.

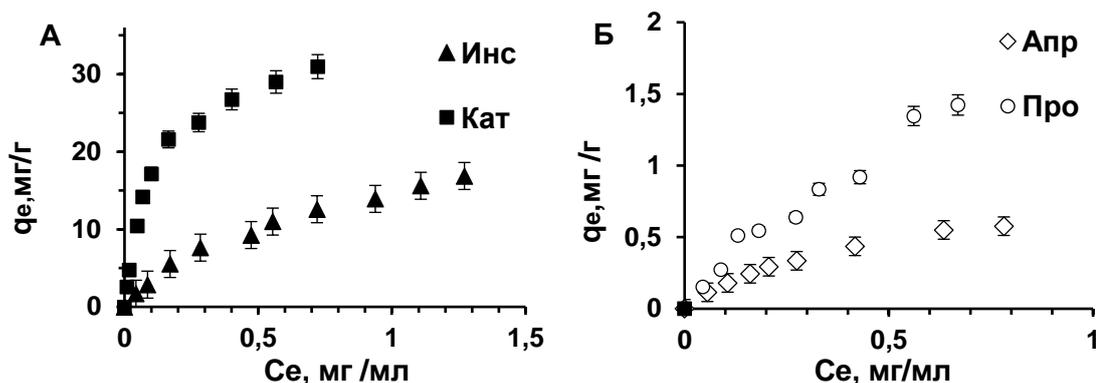


Рис. 3.55. Изотермы адсорбции инсулина и каталазы (А), протамина и апротинина (Б) на микроферах ватерита. Условия: 40 мг/мл CaCO_3 , 30 мин, рН 9,0, 25°C. C_e - равновесная концентрация белка.

Экспериментальные изотермы включения белков в микроферы ватерита были впервые проанализированы исходя из предположения о монослойной адсорбции Ленгмюра (табл. 3.22). Значения максимальной адсорбции для отрицательно заряженных в условиях эксперимента высокомолекулярной каталазы и гексамера инсулина были на порядок выше, чем для положительно заряженных низкомолекулярных протамина и апротинина (табл. 3.22). Для высокомолекулярной каталазы константа адсорбционного равновесия была больше, чем для других белков, соответственно и величина $1/K_a$, характеризующая равновесную концентрацию белка, при которой занята половина адсорбционных центров, была минимальной. Отрицательные значения свободной энергии Гиббса для всех белков свидетельствовали о значительном смещении равновесия в сторону адсорбции.

Таблица 3.22. Характеристика белков и параметров их равновесной адсорбции на микроферах ватерита согласно изотерме Ленгмюра

Белок	pI	M_w , кДа	Диаметр молекулы, нм	Гидродинамический диаметр*, нм	q_m , мг/г	K_a , M^{-1}	ΔG , кДж/моль
Инсулин	5,3	5,8	5,1 (гексамер) [369]	5 ± 1	23 ± 2	$(60 \pm 5) \cdot 10^3$	-27 ± 1
Каталаза	5,4	250	10,5 [370]	10 ± 2	35 ± 2	$(2380 \pm 150) \cdot 10^3$	-36 ± 2
Апротинин	10,5	6,5	2,9 [372]	3 ± 1	$1,1 \pm 0,3$	$(11 \pm 2) \cdot 10^3$	-23 ± 1
Протамин	11,0	5	3,0 [372]	4 ± 1	$3,4 \pm 0,5$	$(5,3 \pm 0,8) \cdot 10^3$	-21 ± 1

*Определен с помощью ДЛС в насыщенном растворе CaCO_3 (~рН 9).

По данным КЛСМ каталаза и инсулин, меченные флуоресцентными красителями, при адсорбции распределялись по всему объему микрофер ватерита (рис. 3.56).

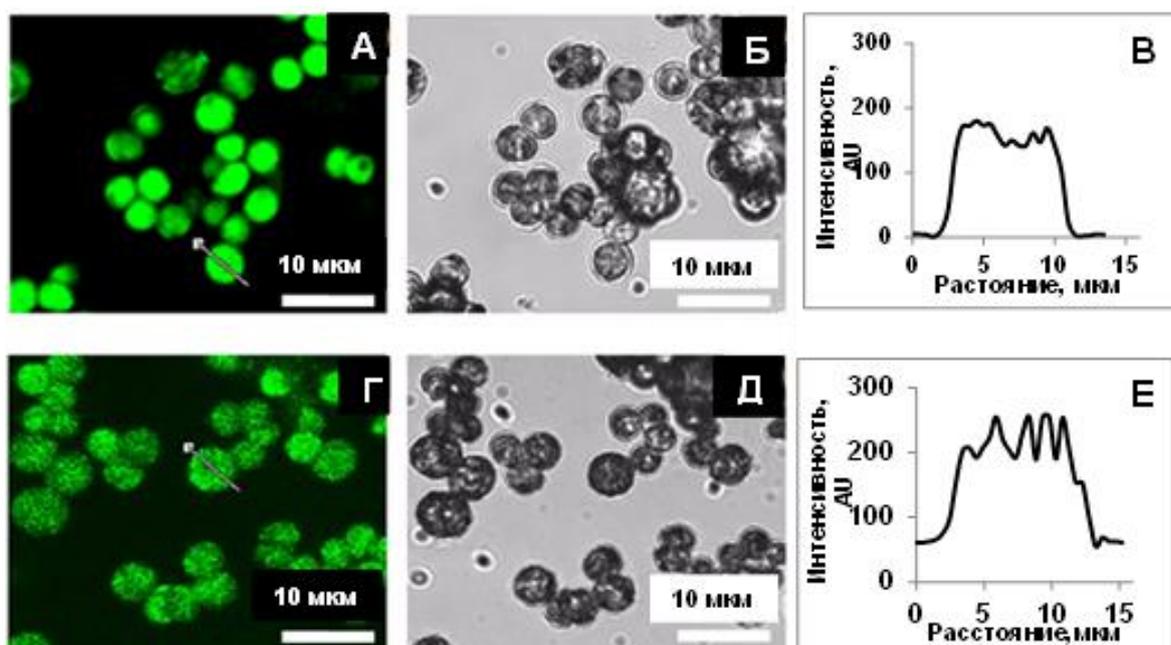


Рис. 3.56. КЛСМ фотографии микрофер ватерита с адсорбированным инсулином-ФИТЦ (А, Б) и каталазой-ФИТЦ (Г, Е): А, Г - флуоресценция; Г, Д - трансмиссия; В, Е - профили флуоресценции микрофер для А и Г.

Однако флуоресцентный сигнал инсулина-ФИТЦ с гидродинамическим диаметром 5 мкм внутри микрофер был гомогенным (рис. 3.56 А, Б), а каталазы-ФИТЦ с гидродинамическим диаметром 10 мкм - неравномерным (рис. 3.56 Г, Д), свидетельствуя о возможности проникновения высокомолекулярного белка не во все поры сорбента.

Промывка микрофер с сорбированными белками с целью прогнозирования их возможного высвобождения при последующей послойной адсорбции полиэлектролитов выявила (табл. 3.23) для каталазы с самой низкой энергией Гиббса наиболее прочное удерживание. Инсулин в виде гексамера и протамин со стержнеобразной структурой удерживались в микроферах лучше, чем аprotинин с самым малым гидродинамическим диаметром.

Таблица 3.23. Характеристика процесса включения белка в микроферы ватерита адсорбцией и последующих промывок сорбента. Условия: 1 мг/мл белка, 40 мг/мл CaCO₃, pH 9

Белок	Содержание белка, мг/г CaCO ₃		Эффективность удерживания белка после промывок, % от включившегося	Сохранение удельной активности после растворения CaCO ₃ с помощью ЭДТА, %
	После адсорбции	После промывок		
Протамин	1,5±0,1	1,1±0,1	54	-
Апротинин	0,63±0,05	0,10±0,02	16	100±4
Инсулин	11±1	7±1	64	-
Каталаза	20,3±1,0	20,0±1,2	99	79±5

Сохранение активности сорбированных аprotинина и каталазы было определено после растворения карбонатной матрицы с использованием ЭДТА (табл. 3.23). Стабильный при высоких значениях pH аprotинин (рис. 3.57) полностью сохранил свою ингибирующую активность по отношению к трипсину после растворения микросфер. pH-чувствительная каталаза (рис. 3.57) сохраняла 79 % удельной активности исходного фермента.

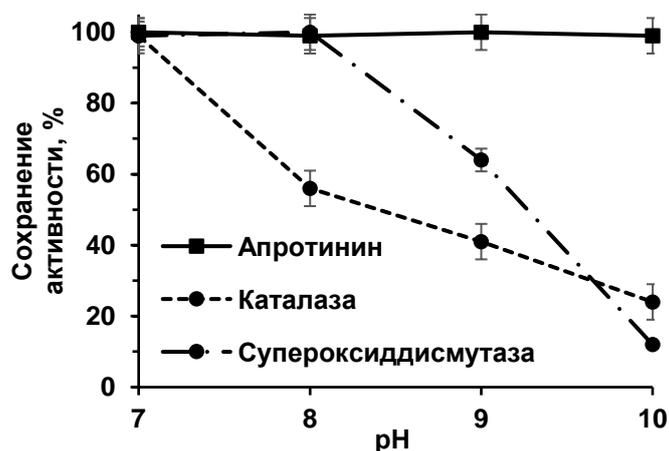


Рис. 3.57. Влияние pH на сохранение активности белков в растворе. Условия: белок 1 мг/мл, 1 ч, 22 °С.

При сосаждении в микросферы ватерита (рис. 3.53, А3) белки предварительно добавляли в раствор CaCl_2 до достижения нужной концентрации. Анализ включения белка в микросферы ватерита сосаждением (табл. 3.24) выявил высокое включение отрицательно заряженных каталазы и инсулина, которое не изменялось при последующих промывках сорбента. Эффективность включения положительно заряженных низкомолекулярных аprotинина и протамина была низкой, а при последующих промывках высвобождалось до 50 % сосажденного белка. С увеличением концентрации белков при формировании микросфер ватерита их содержание в препаратах увеличивалось.

После растворения CaCO_3 с помощью ЭДТА активность аprotинина, не зависящая от pH среды, полностью сохранялась, а активность pH-чувствительной каталазы подала до 5 - 12 % от активности исходного фермента (рис. 3.57).

Для каталазы было проведено дополнительное сравнение загрузки в микросферы ватерита с помощью адсорбции и сосаждения. Изучение с помощью ДЛС гидродинамического диаметра каталазы (рис. 3.58) в растворах, использованных для формирования микросфер ватерита, и в супернатанте, собранном при получении микросфер, выявило, что в присутствии CaCl_2 происходила агрегация белка, а в остальных растворах фермент присутствовал в форме мономера.

Таблица 3.24. Характеристика включения белка в микросферы ватерита путем соосаждения и последующих двух промывок сорбента

Белок	Концентрация белка, мг/мл	Эффективность включения белка, %		Содержание, мг/г CaCO ₃		Сохранение удельной активности после растворения CaCO ₃ с помощью ЭДТА, %
		После соосаждения	После промывок	После соосаждения	После промывок	
Протамин	0,1	15±1	<1	0,9±0,1	<0,02	-
	0,5	23±2	11±1	7,3±0,6	3,5±0,3	-
	1,0	28±2	18±1	17,2±1,0	11,1±0,8	-
Апротинин	0,1	18±2	4,0±0,3	1,0±0,1	0,50±0,05	100±4
	0,5	22±2	7,1±0,8	7,0±0,6	1,6±0,2	100±4
	1,0	25±2	14±1	15,9±1,1	2,8±0,2	100±4
Инсулин	0,1	72±7	62±5	4,3±0,5	3,7±0,4	-
	0,5	74±8	69±5	22,0±1,0	20,5±1,0	-
	1,0	75±5	70±5	43,5±3,1	41,1±3,2	-
Каталаза	0,1	99±6	96±5	5,4±0,5	5,1±0,5	5±1
	0,5	98±7	97±6	25,3±1,7	25,0±1,4	10±1
	1,0	93±7	92±6	49,4±3,0	48,8±2,9	12±1

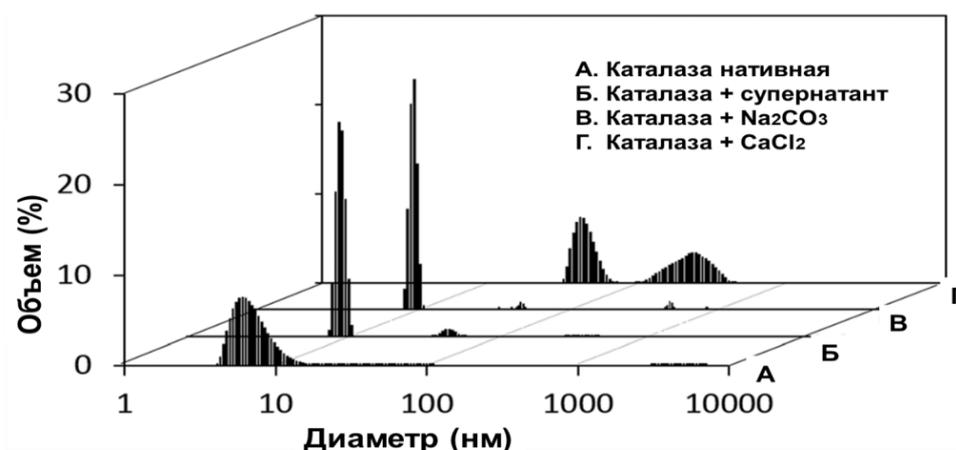


Рис. 3.58. Распределение по размерам каталазы в водном растворе (А), в присутствии супернатанта микросфер ватерита (Б), и в растворах 0,2 М Na₂CO₃ (В) и 0,2 М CaCl₂ (Г).

Анализ зависимости содержания белка от равновесной концентрации каталазы при адсорбции и соосаждении в микросферы ватерита (рис. 3.59) был осуществлен с использованием трех математических моделей адсорбции белков из жидкой фазы на твердую поверхность:

монослойной адсорбции по Ленгмюру (уравнение 3.1), монослойной адсорбции по Фрейндлиху (уравнение 3.2) и многослойной адсорбции по теории Брунауэра-Эммета-Теллера (БЭТ, уравнение 3.3) [383, 384], результаты анализа которых приведены в табл. 3.25.

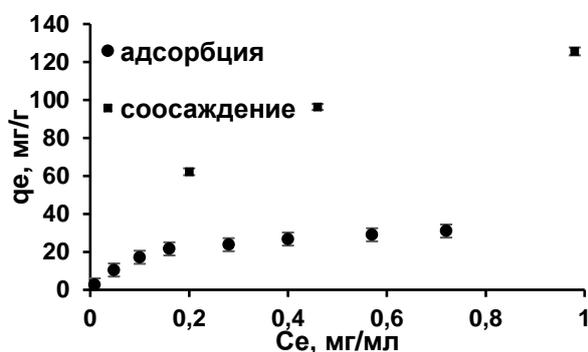


Рис. 3.59. Влияние равновесной концентрации каталазы на содержание белка при адсорбции и соосаждении в микросферы ватерита. Условия: pH 9,0, 22 °С. C_e - равновесная концентрация.

Таблица 3.25. Математическое моделирование включения каталазы в микросферы ватерита методами адсорбции и соосаждения (рис. 3.59)

Модель	Равновесные параметры		Коэффициент детерминации	
	Адсорбция	Соосаждение	Адсорбция	Соосаждение
Ленгмюра	q _m = 35±2 мг/г K _a = (23±1)·10 ⁵ M ⁻¹	q _m = 203±5 мг/г K _a = (5±1)·10 ⁵ M ⁻¹	0,987	0,969
Фрейндлиха	K _F = 46±1 n = 0,5±0,1	K _F = 117±5 n = 0,3±0,1	0,932	0,947
БЭТ	q _{mono} = 30±3 мг/г K _S = (29±2)·10 ⁵ M ⁻¹ K _L = (36±5)·10 ³ M ⁻¹	q _{mono} = 206±4 мг/г K _S = (4,7±0,2)·10 ⁵ M ⁻¹ K _L = 405±5 M ⁻¹	0,996	0,986

Модель адсорбции по Ленгмюру применима для монослойной адсорбции, описывающей образование только одного слоя белка на поверхности микросфер ватерита. Взаимодействия между белковыми молекулами считаются незначительными, что означает, что данная модель не предусматривает межбелковые взаимодействия, такие как агрегация белка:

$$q_e = \frac{q_m K_a C_e}{1 + K_a C_e} \quad (3.1)$$

где q_e - равновесная адсорбция, мг/г CaCO₃; q_m - максимальное значение адсорбции монослоя, мг/г; C_e - равновесная концентрация белка, мг/мл; K_a - константа адсорбционного равновесия, мл/мг.

Модель монослойной адсорбции по Фрейндлиху разработана с учетом эмпирических величин. Модель применяется для начального участка изотермы адсорбции и описывает адсорбцию под действием притяжения (n>1) или отталкивания (n<1) молекул белка:

$$q_e = K_F C_e^n \quad (3.2)$$

где q_e - равновесная адсорбция, мг/г CaCO_3 ; K_F - константа по Фрейндлиху (отражает адсорбционную ёмкость); C_e - равновесная концентрация белка, мг/мл; n - константа нелинейности.

Уравнение БЭТ основано на допущении адсорбции белка на поверхности адсорбента (константа равновесия K_S) или на другой молекуле, которая уже сорбировалась на поверхности (константа равновесия K_L):

$$q_e = \frac{q_{\text{mono}} K_S C_e}{(1 - K_L C_e)(1 + K_S C_e - K_L C_e)} \quad (3.3)$$

где q_e - равновесная адсорбция, мг/г CaCO_3 ; C_e - равновесная концентрация белка, мг/мл; q_{mono} - максимальное значение адсорбции, мг/г; K_S - константа равновесной адсорбции связывания молекул на участке сильной адсорбции (поверхность ватерита - белок), мл/мг; K_L - константа равновесной адсорбции связывания молекул на участке слабой адсорбции (белок - белок), мл/мг.

Согласно данным табл. 3.25 модель Фрейндлиха наименее точно описывала экспериментальные изотермы адсорбции для обоих методов включения, так как, по-видимому, молекулы каталазы адсорбируются независимо от влияния возможной агрегации. Для модели БЭТ, допускающей адсорбцию белка на поверхности адсорбента (константа равновесия K_S) или на другой молекуле, которая уже адсорбировалась на поверхности (константа равновесия K_L), значения коэффициентов детерминации было выше, чем для уравнения Ленгмюра, примененного для монослойной адсорбции и не предусматривающего межбелковые взаимодействия, такие как агрегация белка.

При соосаждении максимальная адсорбция белка была в шесть раз выше, а константа адсорбционного равновесия в шесть раз меньше, чем при адсорбции. Значения энергии Гиббса, составившие -36 ± 2 и -32 ± 7 кДж/моль для методов адсорбции и соосаждения каталазы соответственно, свидетельствовали о большем сродстве белка в процессе адсорбции.

Включение каталазы в микросферы ватерита было оценено с использованием трех моделей возможного расположения молекул белка в порах частиц (рис. 3.60). Данные обсчета моделей не приводятся, так как представлены авторами в [С11], а результаты показаны в табл. 3.26.

В модели А молекулы каталазы гомогенно покрывали доступную поверхность микросфер с удельной площадью поверхности $10,4 \text{ м}^2/\text{г}$. В модели Б все поры микросфер имели цилиндрическую форму и были способны загружать один слой каталазы (диаметр пор равен диаметру молекулы каталазы). В модели В поры микросфер также имели цилиндрическую форму, но их диаметр рассчитывали из экспериментального распределения пор по размеру (рис. 3.44).

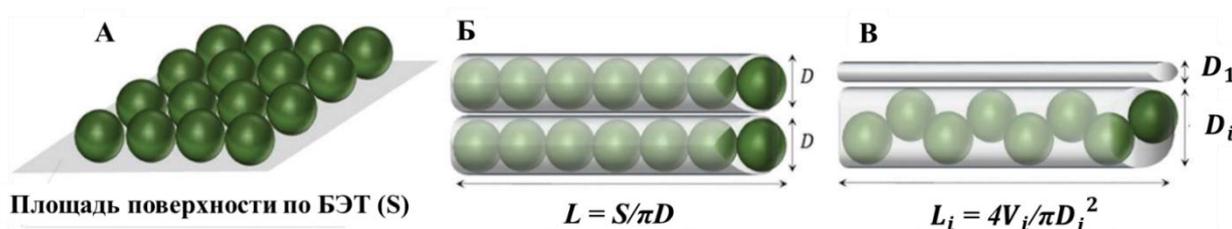


Рис. 3.60. Схематическое представление моделей, используемых для оценки максимальной адсорбции каталазы в порах микросфер ватерита. L , D , V - длина, диаметр и объем цилиндрических пор соответственно.

Таблица 3.26. Максимальные значения адсорбции каталазы, рассчитанные согласно моделям А, Б, В на рис. 3.60

Модель адсорбции	q_{max} , мг/г CaCO_3
А	40
Б	13
В	2

Теоретические расчеты максимального значения адсорбции каталазы, полученные для модели А, были близки с экспериментальными данными для метода адсорбции (табл. 3.25). Модели Б и В показали заниженные значения максимальной адсорбции, следовательно, стерические затруднения не влияли на адсорбцию фермента. Для молекул каталазы оказались доступны не только поры с диаметром больше размера молекул белка, но и поры цилиндрической формы с сосудоподобными расширениями, которые могут содержать большее количество молекул фермента.

Оценка адсорбции каталазы на микросферах ватерита выявила, что значение максимальной адсорбции 35 мг/г отвечало 82 % монослойному заполнению белком поверхности частиц. Для процесса соосаждения каталазы аналогичная величина составила 203 мг/г, следовательно, доступная для загрузки фермента поверхность оказывалась значительно больше, чем при адсорбции. Согласно расчетам, концентрация каталазы в порах частиц могла достигать 95 и 550 мг/мл для адсорбции и соосаждения соответственно. Выявленные различия адсорбции и соосаждения при включении каталазы хорошо согласовывались с известными результатами включения других белков (лизозим, химотрипсин, бычий сывороточный альбумин, гемоглобин, ингибитор трипсина типа Кунитца, цитохром С [92, 368]).

Влияние концентрации фермента на удерживание в микросферах ватерита после адсорбции и соосаждения проанализировано при последующей промывке частиц при pH 9,0 (рис. 3.61). После двукратной промывки высвобождалось до 25 % сорбированной и 10 % соосажденной каталазы.

Более слабое удерживание сорбированной каталазы в микросферах ватерита может приводить к существенным потерям белка при последующей послойной адсорбции полиэлектролитов.

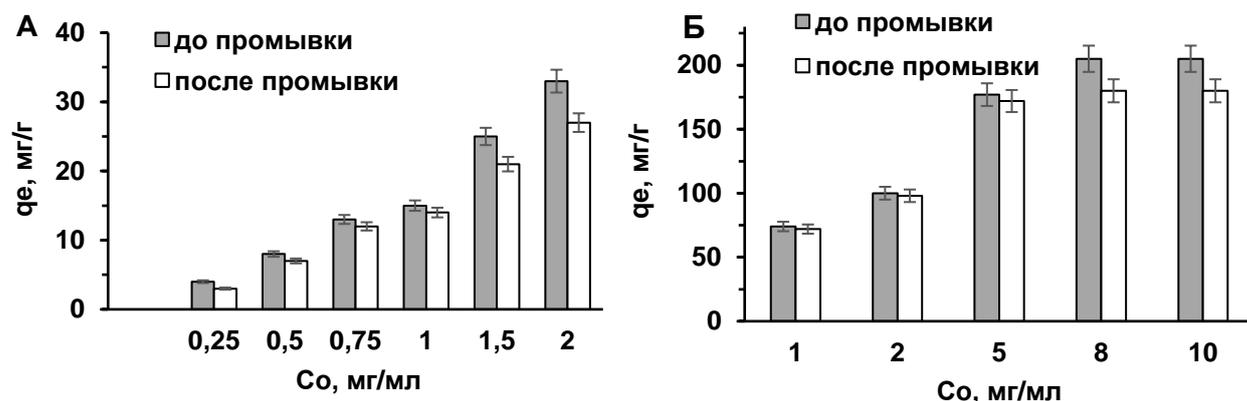


Рис. 3.61. Влияние исходной концентрации каталазы и промывки микросфер на высвобождение белка: А - адсорбированная каталаза; Б - сосажденная каталаза. Условия: 0,05 М глициновый буфер, рН 9,0.

Анализ влияния концентрации NaCl на удерживание каталазы в микросферах (рис. 3.62) выявил высвобождение до 38 % сорбированной каталазы с ростом ионной силы, что связано с преимущественным выделением одиночных молекул из приповерхностных слоев частиц.

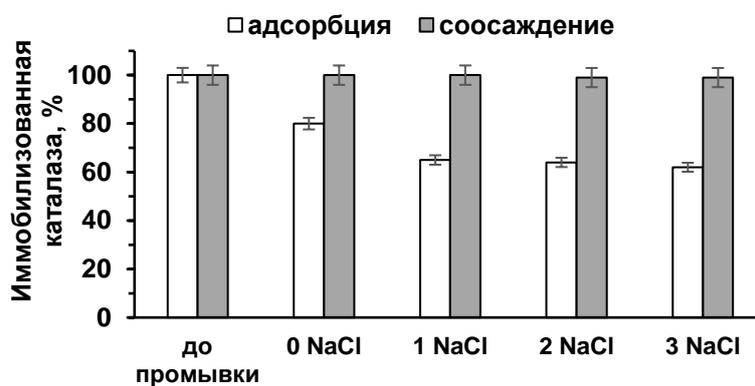


Рис. 3.62. Влияние концентрации NaCl на удерживание белка в микросферах с адсорбированной и сосажденной каталазой. Условия: при включении 2,0 мг/мл белка, 0,05 М трис-буфер, рН 7,0, 22 °С.

Меньшее высвобождение сосажденной каталазы (до 3 %) объясняется наличием агрегированных белковых молекул, образовавшихся при формировании частиц. Таким образом, вклад электростатических взаимодействий каталазы с CaCO₃ не является доминирующим, что подтверждалось адсорбцией на ватерите незаряженных декстранов [49].

На основании анализа данных максимальной адсорбции (табл. 3.25), размера белка в присутствии ионов кальция (рис. 3.58) и удерживания каталазы в микросферах (рис. 3.61, 3.62) можно предположить разный механизм включения белка в микросферы ватерита при адсорбции и сосаждении (рис. 3.63). При адсорбции белок проникает в микросферы только через доступные

поры, где наблюдается его монослойное распределение, в то время как закрытые поры для него остаются недоступными. При сосаждении белок участвует в формировании микросфер ватерита, агрегирует и равномерно распределяется по объему, в том числе и в закрытых порах, что в десятки раз увеличивает доступную для белка площадь поверхности частиц.

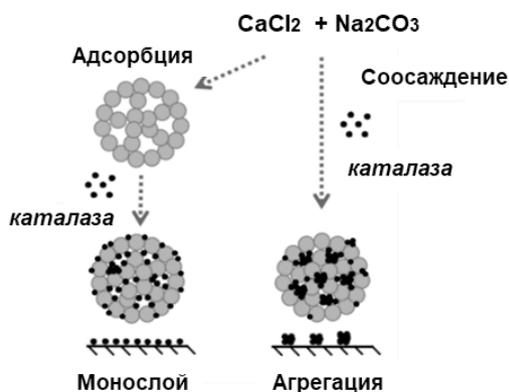


Рис. 3.63. Схематическое представление процессов адсорбции и сосаждения при включении каталазы в микросферы ватерита.

При стандартном получении микросфер ватерита при сливании растворов CaCl_2 и Na_2CO_3 значение рН реакционной среды быстро увеличивается до 10,0 - 10,3 (рис. 3.64), что и приводит к снижению активности рН-чувствительных белков. Для понижения значения рН среды до 8 - 9 процесс формирования микросфер ватерита процесс предложено проводить в присутствии трис-буфера. По данным РФА наличие до 0,2 М трис-буфера в реакционной среде не приводило к изменению ватеритной модификации частиц, а содержание нежелательного кальцита оставалось незначительным.

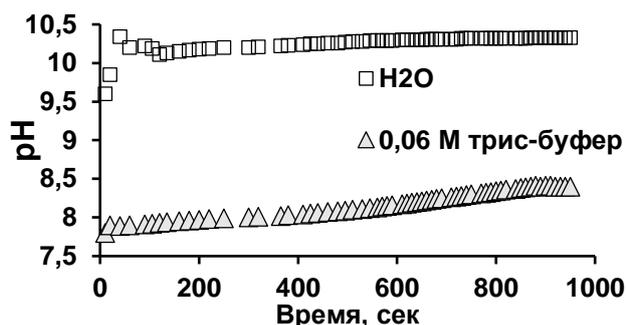


Рис. 3.64. Изменение рН реакционной среды при получении микросфер ватерита методом спонтанной кристаллизации в воде и трис-буфере.

Варьирование рН-среды в интервале 8 - 10 не изменяло отрицательный заряд каталазы ($-6,0 \pm 1,0$, $-7,5 \pm 1,9$, $-12,3 \pm 1,5$ мВ при рН 8, 9, 10 соответственно) и поверхностный заряд микросфер (0 - 12 мВ), поэтому не оказывало существенного влияния на включение фермента методами осаждения и адсорбции (рис. 3.65). Однако во всем диапазоне рН включение при сосаждении было больше, чем при адсорбции.

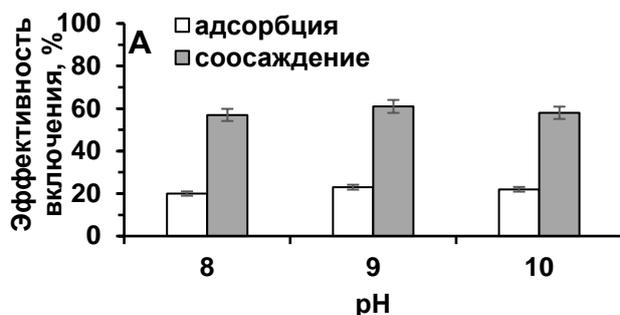


Рис. 3.65. Влияние pH на включение каталазы (1 мг/мл) в микросферы ватерита в 0,05 М трис-буфере.

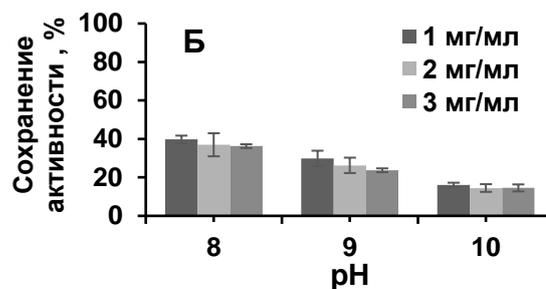


Рис. 3.66. Влияние pH и концентрации белка на сохранение активности соосажденной каталазы после растворения микросфер ЭДТА. Активность нативной каталазы в фосфатном буфере (pH 7,0) принята за 100 %.

Влияние pH среды и концентрации белка на сохранение удельной активности соосажденной каталазы после разрушения частиц добавлением эквимольного количества ЭДТА показано на рис. 3.66. Понижение pH среды с 10 до 8 вызвало повышение удельной активности соосажденного фермента до 8 раз, что однако было меньше аналогичного параметра для нативного фермента, инкубированного в растворе в аналогичных условиях (рис. 3.57). Падение активности нативного фермента при повышении pH среды является результатом диссоциации тетрамеров белка на неактивные мономеры [375]. Влияние концентрации соосажденного белка на активность фермента было незначительным (рис. 3.66). Сравнивая при pH 9 падение активности каталазы соосажденной (70 %), адсорбированной (20 %) и нативной в растворе (60 %), можно предположить, что 10 % снижения активности соосажденного фермента связаны с агрегацией, при которой белок - белковые взаимодействия способны вызывать дополнительную потерю его активности [377].

С помощью КД-спектроскопии исследовано изменение вторичной структуры каталазы после последовательных процессов соосаждения при pH 9,0, растворения карбонатной матрицы с помощью ЭДТА и диализа (рис. 3.67, табл. 3.27).

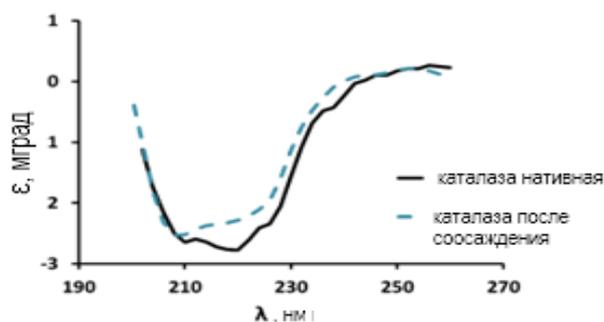


Рис. 3.67. КД-спектры нативной и соосажденной в микросферы ватерита каталазы. Условия: pH 9; для получения каталазы после соосаждения разрушали микросферы с ферментом с помощью ЭДТА, а раствор подвергали диализу.

Таблица 3.27. Вторичная структура каталазы по данным рис. 3.67

Каталаза	α -спирали, %	α -антипараллели, %	β -слои, %	β -изгибы, %	Неупорядоченная структура, %
Нативная	30,0	9,5	9,7	17,4	35,1
Соосажденная	26,5	11,0	10,7	18,3	36,9

Спектр каталазы после процедур соосаждения, растворения мариц ЭДТА и диализа был сдвинут в положительную область при 210 - 240 нм. Для соосажденной каталазы по сравнению с нативной наблюдалось 12 % снижения содержания α -спиралей, и, как следствие, небольшое увеличение содержания α -антипараллелей, β -слоев и β -изгибов. Данные изменения можно объяснить влиянием на вторичную структуру белка соосаждения, рН и воздействия ЭДТА при растворении микросфер ватерита. Однако влияние ЭДТА на вторичную структуру белка обратимо [376], и проведение диализа должно удалить соли ЭДТА. Можно предположить, что потери вторичной структуры могут быть отнесены к влиянию рН и белок-белковых взаимодействиям при формировании агрегатов белка в процессе соосаждения [375].

Подход с понижением рН среды для повышения активности соосажденных ферментов был использован для включения в микросферы ватерита рН-чувствительной (рис 3.55) супероксиддисмутазы (СОД, 32 кДа, рI 4,5, $5 \pm 0,5$ нм [382]), препараты на основе которой активно исследуются для лечения различных заболеваний, связанных с окислительным стрессом, в том числе в офтальмологии [377-381]. Соосаждение супероксиддисмутазы проводили в 0,06 М трис-буфере, что позволило поддерживать в реакционной среде рН не выше 8,3 (рис. 3.64).

Результаты анализа зависимости содержания супероксиддисмутазы в микросферах ватерита от концентрации белка при соосаждении в трис-буфере и воде (рис. 3.68) представлены в табл. 3.28.

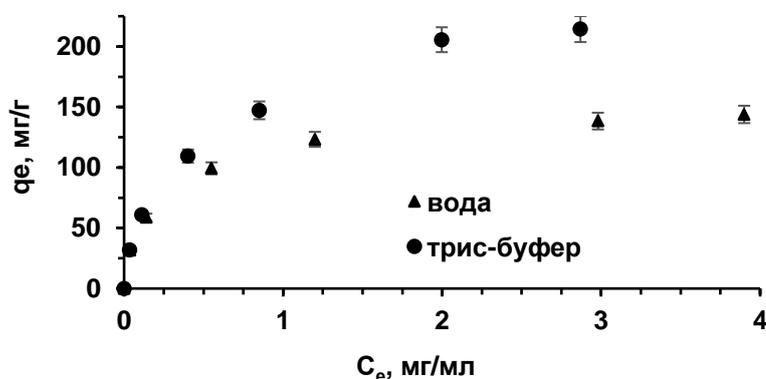


Рис. 3.68. Влияние равновесной концентрации супероксиддисмутазы на содержание белка при соосаждении в микросферы ватерита в воде и 0,05 М трис-буфере (22 °С).

Таблица 3.28. Влияние условий при сосаждении супероксиддисмутазы в микроферы ватерита на параметры включения белка согласно изотерме Ленгмюра и сохранение активности фермента

Среда	q_m , мг/г	K_a , M^{-1}	ΔG , кДж/моль	Сохранение удельной активности фермента после растворения $CaCO_3$, %*
Вода	150 ± 6	$(1,5 \pm 0,07) \cdot 10^5$	-29 ± 1	6 ± 2
0,06 М трис-буфер	240 ± 8	$(0,86 \pm 0,02) \cdot 10^5$	-29 ± 1	48 ± 3

* - концентрация фермента при сосаждении 1 мг/мл

При изменении pH среды формирования микрофер по сравнению с классическими условиями увеличилась максимальная адсорбция и понизилась константа равновесной адсорбции фермента. Высокое значение максимальной адсорбции 240 мг/г свидетельствовало, по аналогии с каталазой, об возможном агрегировании белка внутри частиц. Концентрация супероксиддисмутазы в порах частиц могла достигать 380 мг/мл. Даже при наиболее высокой концентрации фермента при сосаждении микрочастицы сохраняли ватеритную модификацию.

По данным КЛСМ осажденная супероксиддисмутаза, меченная ФИТЦ, с гидродинамическим диаметром молекулы около $6,0 \pm 1,5$ нм гомогенно распределялась внутри микрофер (рис. 3.69).

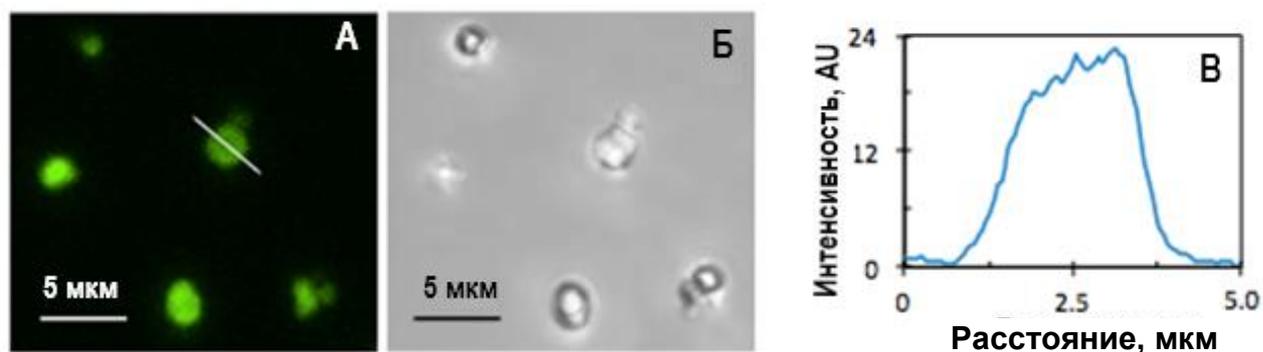


Рис. 3.69. КЛСМ фотографии микрофер ватерита с сосажденной супероксиддисмутазой, меченной ФИТЦ; А - флуоресценция; Б - трансмиссия; В - профиль флуоресценции для А.

Для определения активности супероксиддисмутазы после растворения карбонатной матрицы эквимольным количеством ЭДТА использовали косвенный метод, основанный на ингибировании окисления пирогаллола [332]. При проведении сосаждения в трис-буфере сохранение удельной активности фермента возросло в 8 раз и составило 48 %, (табл. 3.29), что хорошо согласовывалось с данными сохранения активности для сосажденной каталазы.

Для исключения возможного влияния ЭДТА при растворении частиц на активность фермента исследовано высвобождение супероксиддисмутазы из микрофер в растворе 0,15 М NaCl (рис. 3.70). Высвобождения белка в течение первых 20 мин составляло 30 %, а далее

замедлялось и через 2 ч выходило на плато с суммарным выделением 80 - 90 % фермента. После 24 ч инкубации наблюдалось полное выделение белка из частиц. Исследования с помощью РФА и СЭМ (рис. 3.71) выявили через 12 ч частичную, а через 24 ч полную перекристаллизацию ватерита в более стабильный кальцит.

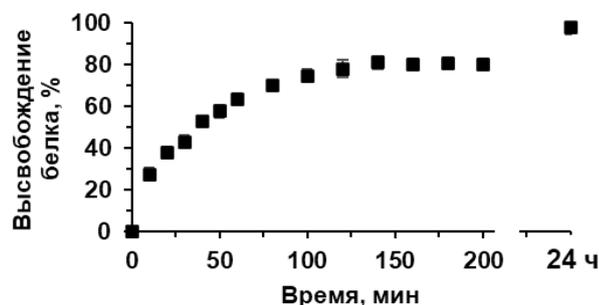


Рис. 3.70. Кинетика высвобождения соосажденной супероксиддисмутазы из микросфер ватерита в растворе 0,15 М NaCl.

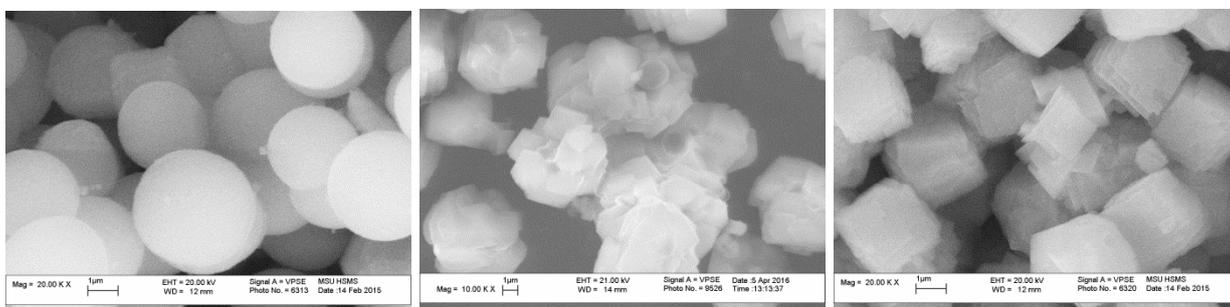


Рис. 3.71. СЭМ фотографии микросфер ватерита с соосажденной супероксиддисмутазой до (А) и после 12 (Б) и 24 (В) часов инкубации в 0,15 М растворе NaCl.

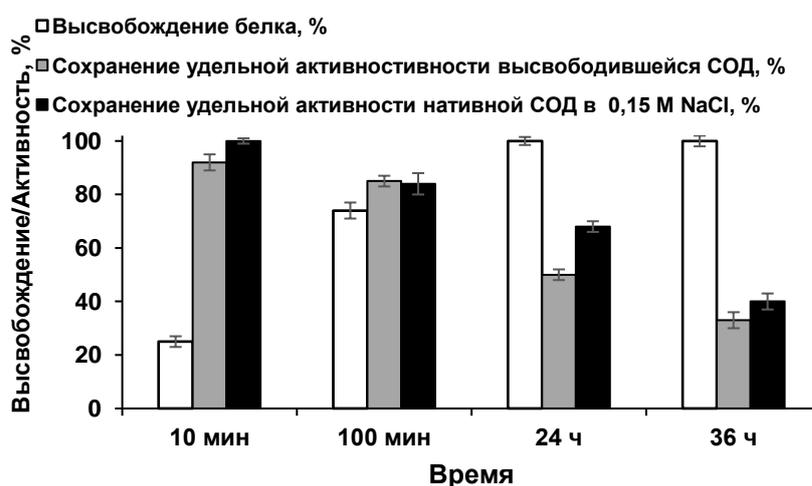


Рис. 3.72. Влияние времени на выделение и свойства соосажденной в микросферы ватерита супероксиддисмутазы, сохранение активности нативного фермента при инкубации в растворе 0,15 М NaCl.

Сохранение удельной активности супероксиддисмутазы, высвободившейся из частиц, через 10 и 100 мин составило 90 и 82 %, а после полного высвобождения белка через 24 и 36 ч понижалось до 50 и 30 % соответственно (рис. 3.72). Аналогичное, но несколько меньшее падение

активности наблюдалось для нативного фермента в растворе (рис. 3.72). По данным ДЛС с увеличением времени инкубации наблюдался рост гидродинамического диаметра выделившейся супероксиддисмутазы от $6,0 \pm 1,5$ нм до $7,1 \pm 1,8$ и $7,9 \pm 2,5$ через 10 мин и 24 ч соответственно, что свидетельствовало о возможной частичной денатурации фермента.

Процесс высвобождения сосажденного белка был пролонгированным и включал (рис. 3.73) в начальный момент времени быстрое выделение активного фермента из открытых пор и частичное растворение приповерхностных нанокристаллитов микросфер ватерита.

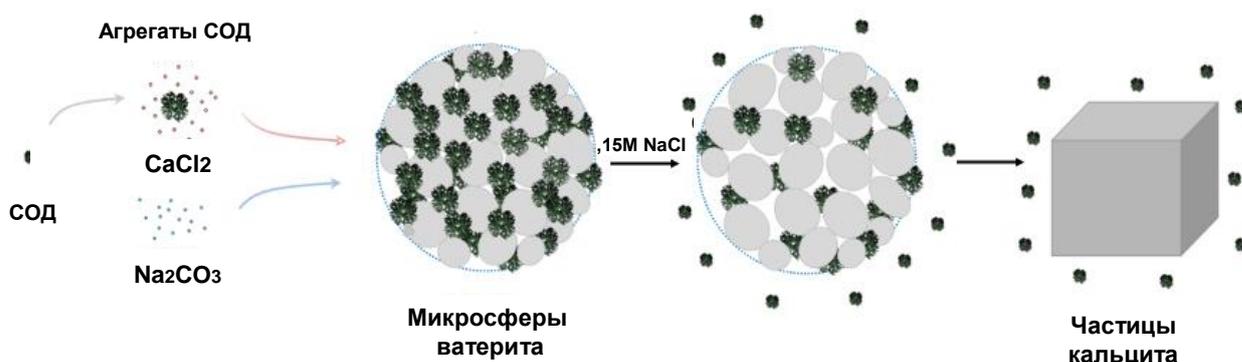


Рис. 3.73. Схема получения микросфер ватерита с сосажденной супероксиддисмутазой и частичного и полного высвобождения фермента при перекристаллизации в кальцит в физиологических условиях.

Возникающие дефекты поверхности микрочастиц служили центрами кристаллизации более стабильной кристаллической модификации кальцита, адсорбционная способность которого из-за малого размера пор низка. При дальнейшей инкубации белок десорбировался и вновь адсорбировался на поверхности частиц, достигая динамического равновесия. С увеличением доли кальцита высвобождение белка в раствор увеличивалось и составляло 100 % при полной перекристаллизации ватерита.

Таким образом, на включение в мезопористые, наноструктурированные микросферы ватерита и сохранение удельной биологической активности белка большое влияние оказывали метод загрузки и свойства белка (табл. 3.29).

Таблица 3.29. Сравнение способов включения белков (1 мг/мл) в микросферы ватерита

Способ включения белка	Белок	Содержание белка, мг/г	Сохранение удельной активности фермента после растворения частиц ЭДТА, %	Потери белка при промывках частиц, %
Адсорбция	Каталаза	$20,3 \pm 1,0$	79 ± 5	≤ 25
	Апротинин	$0,63 \pm 0,05$	100 ± 4	≤ 84
Соосаждение (рН 8)	Каталаза	$49,0 \pm 3,0$	40 ± 7	≤ 10
	Апротинин	$7,0 \pm 0,6$	100 ± 4	≤ 77

Положительно заряженные белки не только хуже включались в микросферы ватерита, чем отрицательно заряженные, но и существенно больше высвобождались при промывках носителя, т.е. при последующей послойной адсорбции полиэлектролитов. На сохранение активности лабильных ферментов в микросферах существенное влияние оказывало значение рН проведения процесса включения белка, регулируемое с использованием буферных растворов. Сохранение активности рН-чувствительных ферментов при сорбции в микросферы ватерита было больше, чем при их соосаждении.

Итоговое сравнение трех возможных способов включения рН-чувствительной каталазы в микросферы ватерита и полиэлектролитные микрокапсулы (ДС-Пр)₂ДС, полученные после растворения матрицы, согласно рис. 3.53, приведено в табл. 3.30.

Таблица 3.30. Сравнение способов включения каталазы в полые микрокапсулы (ДС-Пр)₂ДС, полученные с использованием микросфер ватерита (схема на рис 3.53)

Способ включения	Микросферы ватерита		Микрокапсулы	
	Содержание белка, мг/г СаСО ₃	Сохранение удельной активности фермента после растворения ЭДТА*, %	Содержание белка**, мг/г капсул	Сохранение удельной активности иммобилизованного фермента***, %
Адсорбция в готовые микрокапсулы, рН 7 (путь 1)	-	-	70±10	99±12
Предварительная адсорбция на микросферах ватерита (путь 2)	20±1	79±5	190±20	11±1
Предварительное соосаждение в микросферы ватерита (путь 3)	49±3	40±7	630±40	8±1

* Определено после растворения микросфер ватерита с помощью ЭДТА, рН 9,0; ** определено после разрушения микрокапсул, рН 12; *** - определено непосредственно в полиэлектролитных микрокапсулах.

Содержание иммобилизованного белка в мультислойных микрокапсулах с предварительно соосажденной каталазой было в 3 раза выше, чем с предварительно адсорбированной и в 9 раз выше, чем при загрузке фермента в готовые полые микрокапсулы (табл. 3.30). Сохранение удельной активности иммобилизованного фермента в мультислойных микрокапсулах после предварительного включения в микросферы ватерита методами соосаждения и адсорбции было низким. Каталаза, загруженная в готовые полые микрокапсулы, сохраняла максимальную активность.

По данным КЛСМ родамин встраивался только в стенку капсул (ДС-Пр)₂ДС с ферментом, сорбированным на поверхности готовых частиц (рис. 3.74 А, Б), преимущественно в стенку капсул, с сформированных на микросферах ватерита с предварительно сорбированным белком (рис. 3.74 В, Г), что свидетельствовало о локализации иммобилизованной каталазы в стенках частиц. В микрокапсулах с предварительно соосажденной каталазой флуоресцентный краситель включался как в оболочку, так и во внутрь частиц, что свидетельствовало о распределении фермента по всему объему микрокапсул (рис. 3.74 Д, Е).

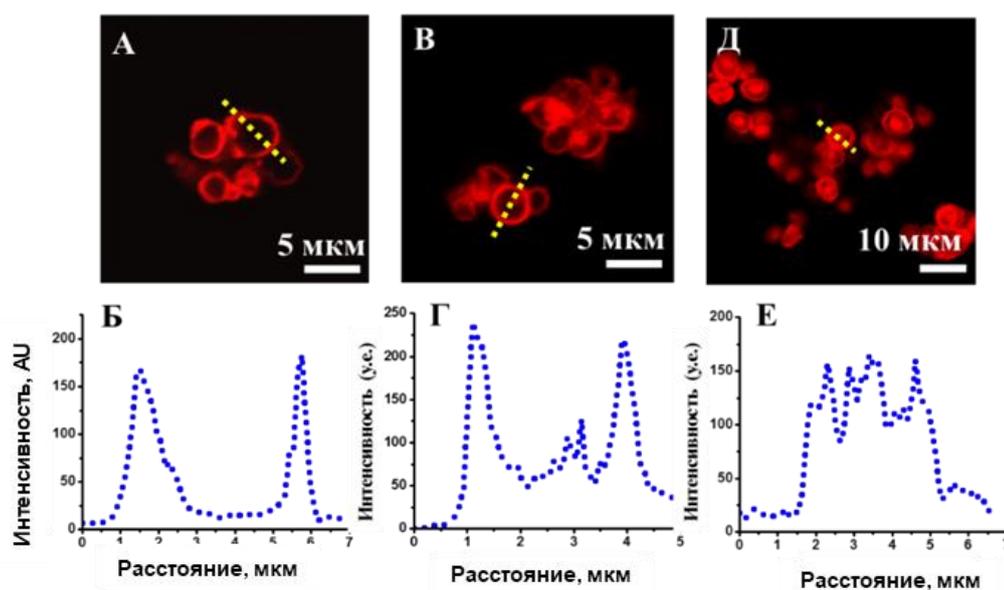


Рис. 3.74. КЛСМ фотографии полиэлектролитных микрокапсул (ДС-Пр)₂ДС с каталазой, включенной в готовые микрокапсулы (А) или предварительно в микросферы ватерита с помощью адсорбции (В) и соосаждения (Г): Б, Г, Е - профили флуоресценции частицы, выделенной на А, В, Г, соответственно. Условия: инкубация с родамином 6G (0,1 мг/мл).

Таким образом, включение белков в готовые мультислойные микрокапсулы позволяет увеличить активность иммобилизованных лабильных ферментов за счет использования наиболее благоприятных условий для загрузки и уменьшения диффузионных затруднений для проникновения субстрата внутрь частиц.

Дополнительное исследование стабильности мультислойных микрокапсул с каталазой в среде с рН 7,4 в течение 6 ч выявило отсутствие высвобождения каталазы, загруженной в готовые микрокапсулы. Из микрокапсул с предварительно соосажденным и адсорбированным ферментом высвобождалось соответственно 7 и 2 % белка. Полученные данные свидетельствовали о прочном связывании фермента в полиэлектролитных микрокапсулах.

Выводы к разделу 3.2.

1. Иммобилизация белков и ферментов в мультислойные полиэлектролитные микрокапсулы, полученные с использованием растворимых матриц, зависела от природы

использованных матриц, а также от способа и условий включения (рН, ионная сила), физико-химических свойств и лабильности белковых препаратов. С уменьшением содержания белка в мультислойных микрокапсулах увеличивалась удельная активность иммобилизованных ферментов.

2. Разработан подход к иммобилизации белков путем сорбции в готовые полиэлектролитные матричные микрокапсулы с единой полимерной сетью, полученные путем послойной адсорбции декстрансульфата и протамина на разлагающихся в мягких условиях меламинаформальдегидных ядрах. Микрокапсулирование характеризовалось высоким включением белков и их содержанием в частицах, зависящими от рН среды. Поскольку белки связывались с матричными микрокапсулами благодаря ионным и гидрофобным силам их включение и высвобождение может контролироваться изменением рН или ионной силы раствора. Высокомолекулярные белки прочно удерживались в микрокапсулах, когда рН их включения и последующего использования совпадали.

3. Проведено сравнение включения белков с различными физико-химическими свойствами в мезопористые, наноструктурированные микросферы ватерита с помощью методов адсорбции и соосаждения. Определены параметры равновесной адсорбции белков при включении в микросферы ватерита. Показано более высокое сохранение удельной активности ферментов при адсорбции на поверхности микросфер ватерита по сравнению с соосаждением. Активность соосажденных рН-чувствительных ферментов может быть увеличена изменением значения рН среды при формировании микросфер ватерита. Предложен механизм включения каталазы в микросферы ватерита при соосаждении и адсорбции, основанный на агрегации белка и механизм процесса высвобождения, основанный на перекристаллизации частиц в кальцит.

4. Сравнение различных путей включения белков и ферментов в полые полиэлектролитные микрокапсулы, полученные послойной адсорбцией декстрансульфата и протамина, выявило максимальное содержание белка в частицах при использовании предварительного соосаждения в микросферы ватерита, а максимальное сохранение удельной активности иммобилизованных ферментов - при загрузке в готовые мультислойные частицы после растворения карбонатной матрицы.

5. Данные об иммобилизации оксидоредуктазных биферментных системах в готовые мультислойные микрокапсулы свидетельствовали о перспективности подхода для создания микрокапсулированных мультиферментных каталитических систем.

3.3. Применение муцина для микрокапсулирования белков

В разделе 3 для придания матрицам и полиэлектролитным микрокапсулам, полученным на основе микросфер ватерита, дополнительных мукоадгезивных свойств был выбран природный

биополимер муцин, который ранее был успешно применен в работе для оценки мукоадгезивных свойств полиэлектролитных микрочастиц (табл. 3.16).

В работе был использован коммерческий муцин из желудка свиньи (далее муцин, М), имеющий в воде поверхностный заряд -15 ± 2 мВ и представленный двумя фракциями с гидродинамическим диаметром 30 - 50 и 200 - 300 нм. По данным хроматографического анализа содержание гликопротеина в коммерческом муцине составляло $87 \pm 3\%$.

Муцин включали в микросферы ватерита СС сорбцией (обозначены СС-М, рис. 3.53 А2) или соосаждением при формировании частиц (далее гибридные микросферы ССМ, рис 3.53 А3) и употребляли в качестве полианиона для послойной адсорбции в паре с протамином (рис. 3.53 В2, В3).

3.3.1. Включение муцина в микросферы ватерита

3.3.1.1. Адсорбция муцина на микросферах ватерита

Сорбцию гликопротеина проводили на микросферах ватерита СС (рис. 3.75 А), физико-химические характеристики которых представлены в табл. 3.31. В микросферах диаметр пор составлял около 25 нм, а поверхностный заряд соответствовал 0,5 мВ.

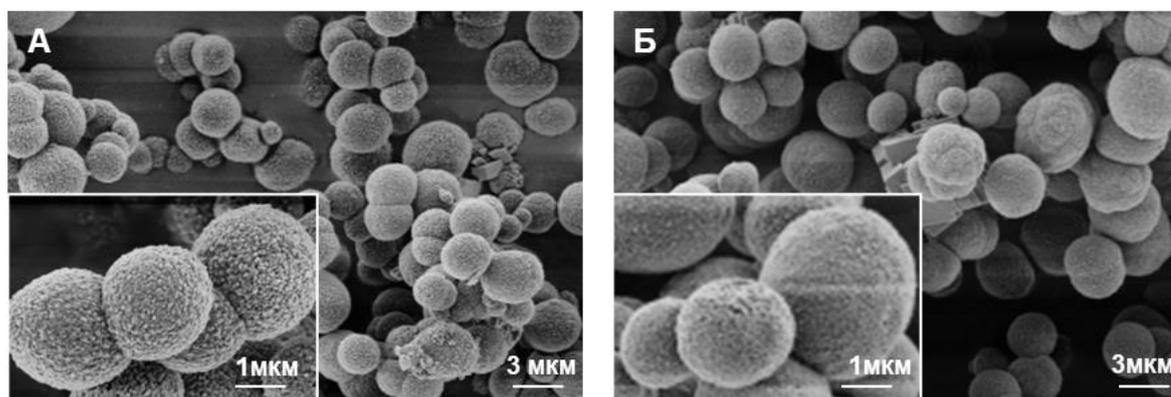


Рис. 3.75. СЭМ фотографии микросфер ватерита СС до (А) и после сорбции муцина (Б).

Таблица 3.31. Физико-химические свойства микросфер ватерита СС

Параметр	Метод анализа	Значение
Содержание ватерита, %	РФА	98,7
Средний диаметр микросфер, мкм	СЭМ	$3,3 \pm 0,8$
ξ -потенциал микросфер, мВ	ДЛС	$0,5 \pm 1,6$
Площадь поверхности микросфер, м ² /г	БЭТ	$4,3 \pm 0,4$
Объем пор, см ³ /г	БЭТ	$0,020 \pm 0,003$
Средний диаметр пор, нм	БЭТ	25 ± 5
Средний диаметр нанокристаллита, нм	СЭМ	109 ± 25

При изучении кинетики сорбции муцина на микросферах ватерита СС выявлено (рис. 3.76), что количество связавшегося гликопротеина резко возрастало за первые 10 мин, медленно

увеличивалось в течение последующих 4 ч и далее выходило на плато. Данные СЭМ не выявили существенных изменений морфологии кристаллов ватерита при сорбции биополимера (рис. 3.75 Б). При включении муцина микросферы приобретали отрицательный поверхностный заряд $-(15\pm 3)$ В, что свидетельствовало о связывании гликопротеина поверхностью частиц. В суспензии микросферы с сорбированным муцином СС-М были менее агрегированными и при хранении меньше подвергались перекристаллизации в термодинамически более стабильный кальцит по сравнению с микросферами ватерита СС.

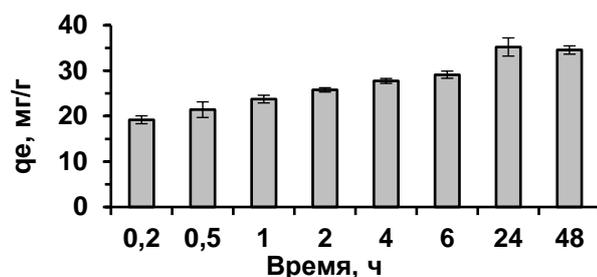


Рис. 3.76. Кинетика сорбции муцина микросферами ватерита СС (20 мг/мл CaCO_3 , 1 мг/мл муцина).

Для понимания распределения гликопротеина внутри микросфер ватерита СС с помощью КЛСМ исследована сорбция муцина, меченного ФИТЦ (рис. 3.77). Через 1 мин биополимер концентрировался на поверхности частиц (рис. 3.77 А, Д, Ж), через 30 мин наблюдалось его частичное проникновение, по-видимому, в виде фракции с гидродинамическим диаметром 30 - 50 нм, внутрь частиц (рис. 3.77 В, Е, Ж).

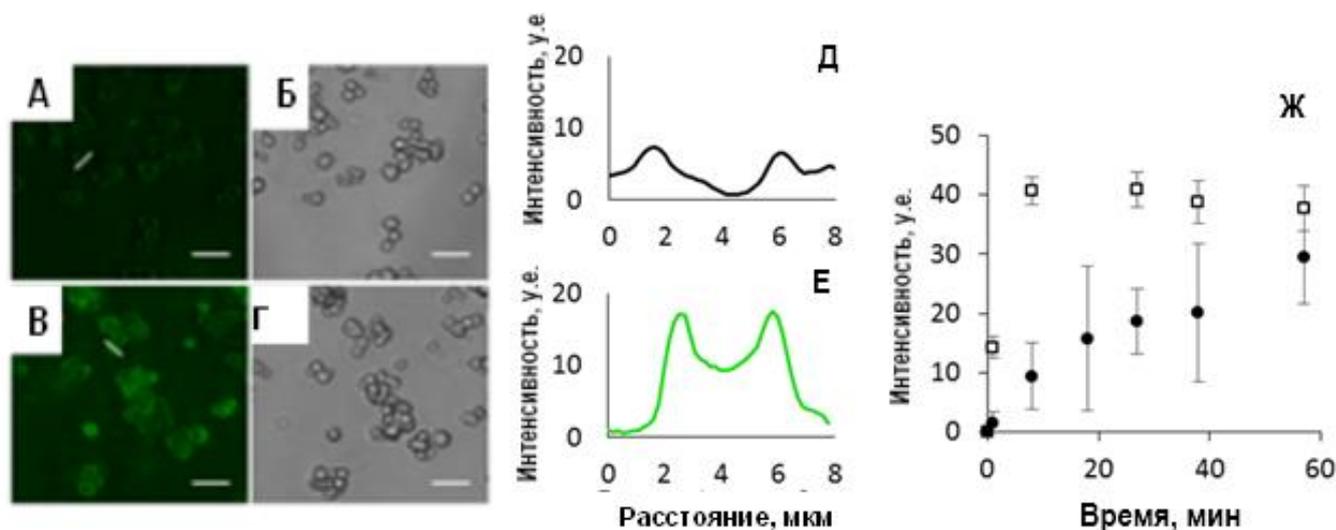


Рис. 3.77. КЛСМ фотографии флуоресценции (А, В) и трансмиссии (Б, Г) микросфер ватерита СС после 1 (А, Б) и 30 мин (В, Г) инкубации в растворе муцин-ФИТЦ: Д, Е - флуоресцентные профили распределения вдоль белых линий на рис. А и В - через 10 и 30 мин соответственно; Ж - кинетика накопления муцина-ФИТЦ на поверхность (белые квадраты) и внутри микросфер (черные круги). Масштабная линейка 10 мкм.

Сравнение включения в микросферы ватерита СС коммерческого, очищенного и десиалированного муцинов выявило, что очищенный препарат, имеющий самую большую абсолютную величину отрицательного поверхностного заряда -27 ± 1 мВ, сорбировался на микросферах на 25 % больше коммерческого. Десиалированный муцин (степень десиалирования 80 %) сорбировался на микросферах на 33 % меньше коммерческого. Различия включения препаратов свидетельствовали о роли сиаловых кислот, и, следовательно, электростатических взаимодействий при сорбции гликопротеина на микросферах ватерита СС. Как известно, при онкологических заболеваниях в муцинах наблюдается возрастание содержания сиаловых кислот [166], что может приводить к возрастанию связывания муцина при биоминерализации микрочастиц карбоната кальция.

В связи со существенной зависимостью заряда, конформации, агрегации и реологических свойств муцина от условий окружающей среды [383-386] сравнена сорбция биополимера на микросферах ватерита СС в воде, при различных рН и концентрациях NaCl, а также в присутствии органического растворителя и додецилсульфата натрия (рис 3.78).

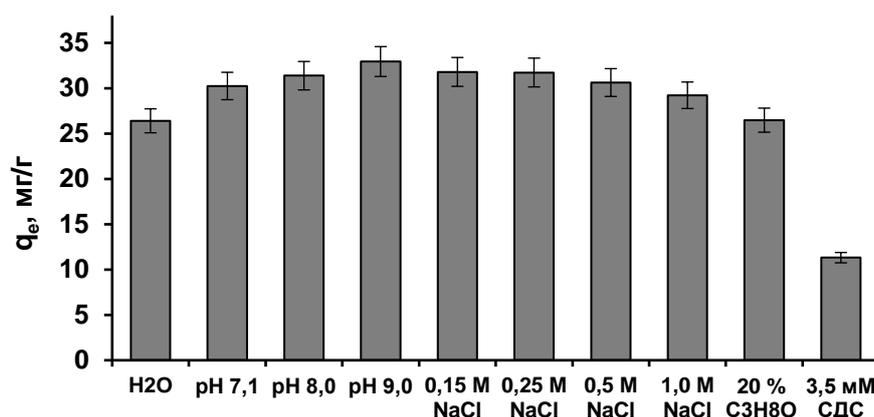


Рис. 3.78. Влияние среды на сорбцию муцина (1 мг/мл) на микросферах ватерита СС. Условия: 1 ч, 40 мг/мл СС, 0,05 мМ трис-буфер при рН 7 - 9.

Количество сорбированного муцина незначительно возрастало с увеличением рН среды от 7 до 9, так как при этом мало изменялись отрицательный заряд муцина (pI 3 - 4) [143] и заряд микросфер ватерита близкий к нулевому значению. С ростом концентрации NaCl до 0,15 М количество адсорбированного муцина несколько увеличивалось. Такое явление можно объяснить уменьшением электростатического отталкивания между молекулами гликопротеина в присутствии соли, что хорошо согласуется с результатами, описанными в [383]. При дальнейшем возрастании концентрации соли до 1 М количество связанного муцина постепенно уменьшалось, что могло свидетельствовать о существенной роли гидрофобных взаимодействий негликозилированных участков молекул при сорбции. Наличие 20 % изопропанола не изменило о

включения муцина по сравнению с процессом в воде, что подтверждало наличие гидрофобных взаимодействий. Присутствие додецилсульфата натрия (СДС), экранирующего заряд молекулы гликопротеина и ослабляющего гидрофобные взаимодействия между негликозилированными частями молекул, существенно снижало связывание муцина. Таким образом, сорбция муцина, и следовательно, мукоадгезивные свойства микросфер ватерита СС, изменялись в зависимости от условий внешней среды, что важно для их использования при мукозальной доставке БАВ.

Изучение ступенчатой сорбции муцина на микросферах ватерита СС выявило с ростом числа стадий сорбции (S) уменьшение постадийного связывания и увеличение суммарного включения биополимера (рис. 3.80), в то время как их поверхностный заряд не изменялся, варьируя в интервале $-(12-15)$ мВ. Такое явление возможно за счет перераспределения муцина на поверхности микросфер или дополнительного связывания его слоев за счет дисульфидных связей, водородных или гидрофобных взаимодействий. С использованием метода Элмана [387] было показано отсутствие свободных SH-группы в коммерческом муцине, поэтому образования дополнительных дисульфидных связей не происходило. Растворение ватеритной матрицы в микросферах СС-М с помощью ЭДТА привело к полному распаду частиц с многократно сорбированным гликопротеином.

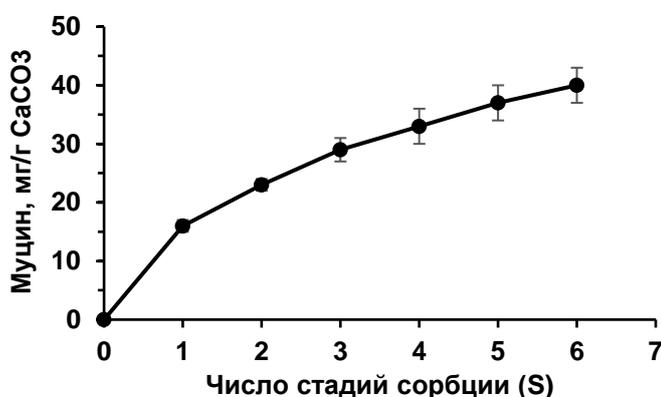


Рис. 3.79. Ступенчатая сорбция муцина (1 мг/мл) на микросферах ватерита СС.

В связи с существенным влиянием концентрации муцина на агрегацию и гелеобразующие свойства [144] проанализировано влияние этого параметра на сорбцию микросферами ватерита СС. Верхнее значение использованной концентрации муцина 6 мг/мл было близко к концентрации муцина в слизи ЖКТ [143]. На основании полученных данных построена зависимость содержания муцина в микросферах ватерита СС от его концентрации (рис. 3.80), которая, как и ранее для белков, была проанализирована, исходя из предположения о монослойной адсорбции Ленгмюра.

Максимальное значение адсорбции и константа адсорбционного равновесия для муцина оказались, соответственно, в 4,6 раз больше и 3,6 раз меньше, чем аналогичные величины при

адсорбции высокомолекулярной каталазы (табл. 3.25), имеющей близкий заряд, но меньший диаметр молекулы.

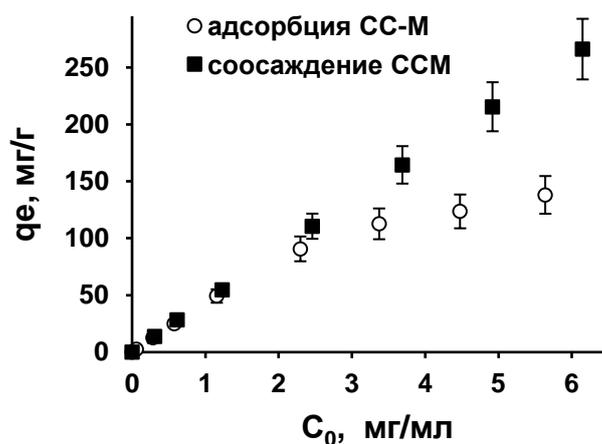


Рис. 3.80. Влияние концентрации муцина на содержание гликопротеина при адсорбции (СС-М) и соосаждении (ССМ) в микроферы ватерита.

Энергии Гиббса процесса адсорбции муцина составила -35 ± 4 кДж/моль и была близка к значениям, полученным для ранее исследованных белков.

3.3.1.2. Соосаждение муцина в микроферы ватерита

С ростом концентрации муцина при соосаждении в микроферы ватерита ССМ наблюдалось не только существенно большее включение биополимера по сравнению с сорбцией СС-М (рис. 3.80), но и изменение морфологии частиц. С помощью физико-химических методов анализа проведено сравнение микрофер ватерита СС и гибридных микрофер ССМ, полученных в 0,05 М трис-буфере с рН 7,0 в присутствии 5 мг/мл муцина (табл. 3.32).

Таблица 3.32. Физико-химические свойства микрофер ватерита СС и гибридных микрофер ССМ

Параметр	Метод анализа	Микроферы	
		СС	ССМ
Содержание ватерита, %	РФА	$98,7 \pm 0,3$	$99,3 \pm 0,2$
Средний диаметр микрофер, мкм	СЭМ	$3,3 \pm 0,8$	$5,8 \pm 0,7$
ζ -потенциал микрофер, мВ	ДЛС	$0,5 \pm 1,6$	$-(7,0 \pm 0,6)$
Площадь поверхности микрофер, м ² /г	БЭТ	$4,3 \pm 0,4$	$37,6 \pm 2,9$
Объем пор, см ³ /г	БЭТ	$0,020 \pm 0,003$	$0,082 \pm 0,06$
Средний диаметр пор, нм	БЭТ	25 ± 5	8 ± 1
Средний диаметр нанокристаллита, нм	СЭМ	109 ± 25	47 ± 7
Диаметр молекулы БАВ, доступной для проникновения в микроферу*, нм	СЭМ	16 ± 4	7 ± 1

*Диаметр молекулы составляет 15% от диаметра нанокристаллита [111].

Наличие биополимера при формировании частиц уменьшало содержание нежелательного кальцита и придавало отрицательный поверхностный заряд микросферам ССМ, который был несколько меньше, чем при сорбции. По данным СЭМ гибридные микросферы ССМ имели 1,8 раз больший диаметр и в 2 раза меньший размер нанокристаллитов по сравнению с микросферами ватерита СС (рис. 3.81). Максимальный размер молекул, имеющих доступ к свободному объему микросфер, равный 15 % от размера нанокристаллита [111], составлял 7 и 16 нм для частиц ССМ и СС соответственно.

С помощью низкотемпературной адсорбции - десорбции азота по методу БЭТ изучены изотермы адсорбции и десорбции азота на микросферах СС и ССМ (рис. 3.82 А). Изотерма для микросфер ССМ относилась к типу IV по классификации Брунауэра, Деминга, Деминга и Теллера, что свидетельствовало о мезопористости образца. Петли гистерезиса изотерм соответствовали смешанному типу А + Е (цилиндрические поры + поры типа «чернильницы», т.е. «закрытые» поры).

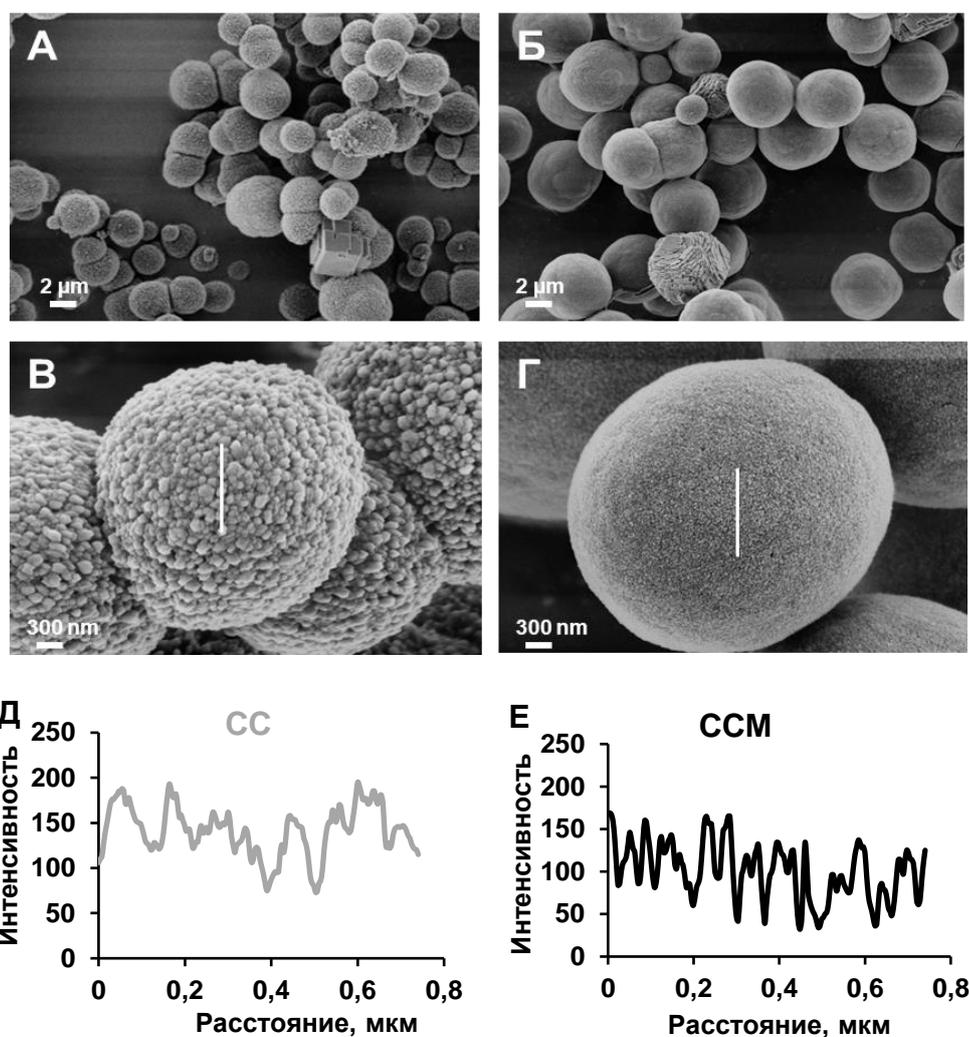


Рис. 3.81. СЭМ фотографии (А - Г) и профили поверхности (Д - Е) микросфер ватерита СС (А, В, Д) и гибридных микросфер ССМ (Б, Г, Е). Проанализированные участки поверхности микросфер для анализа размера нанокристаллитов показаны белой линией на рис. Д и Е.

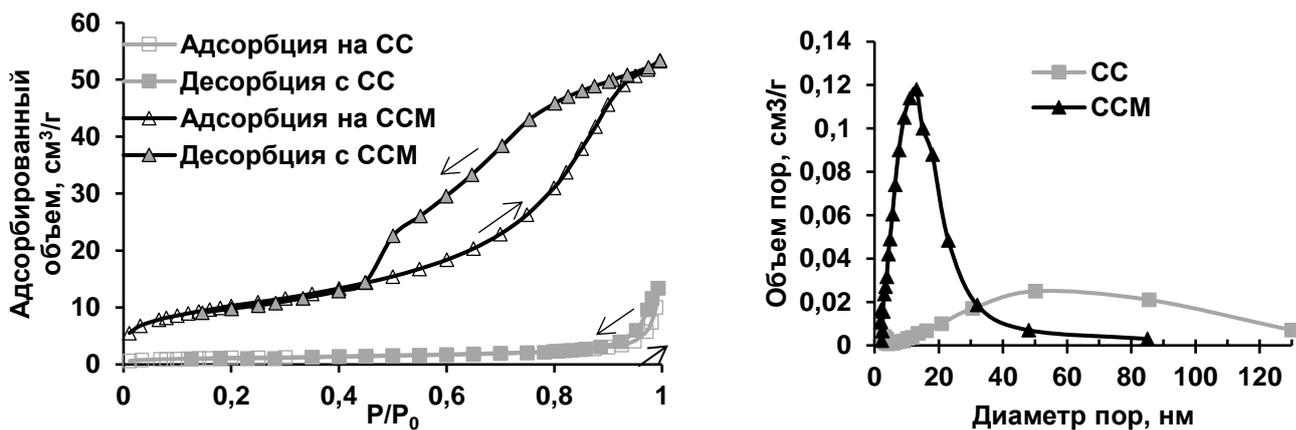


Рис. 3.82. Изотермы адсорбции и десорбции азота (А) и распределение пор по размерам по методу БЭТ (Б) для микросфер ватерита СС и гибридных микросфер ССМ.

С помощью метода Barrett-Joyner-Halenda из изотерм были определены объем и средний диаметр пор (табл. 3.32), а также их распределение по размеру в микросферах (рис. 3.82 Б). Объем пор микросфер ССМ превышал в 4 раза аналогичную величину для микросфер СС. Диаметр пор микросфер ССМ был почти в три раза меньше диаметра пор микросфер СС. Площадь поверхности частиц ССМ (табл. 3.32) превышала 8,6 раз площадь поверхности частиц СС. Обнаруженные изменения свойств микросфер с соосажденным муцином ССМ подтверждали их гибридность.

Изменение морфологии гибридных микросфер ССМ связано с изменением вязкости реакционной среды при формировании частиц в присутствии гликопротеина и с взаимодействием карбоксильных групп муцина с ионами кальция и образующимися нанокристаллитами (рис. 3.83).

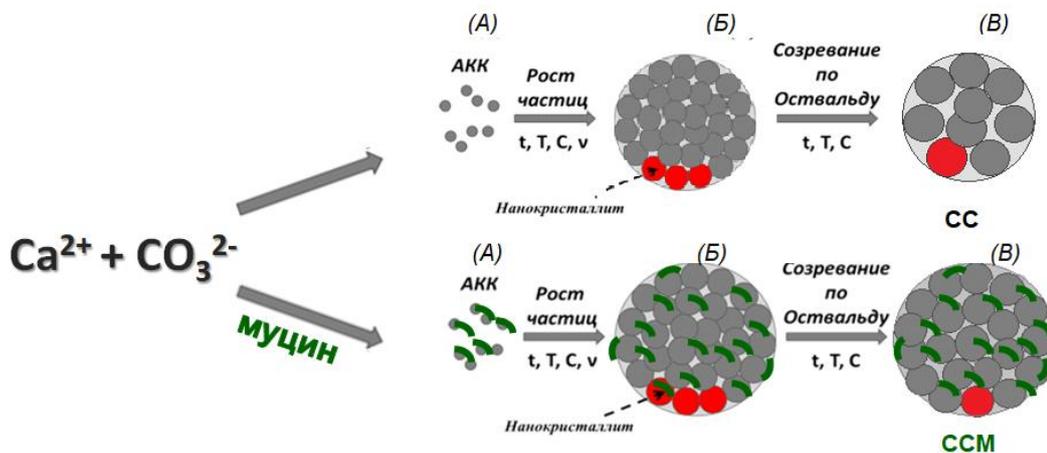


Рис. 3.83. Схема получения и предполагаемый механизм кристаллизации микросфер ватерита СС и гибридных микросфер ССМ. (А) - аморфный карбонат кальция (АКК), Б - первоначальный зародыш кристаллизации, из которого в процессе созревания по Освальду образуется кристалл ватерита (В).

Подобные взаимодействия согласно [131] могут замедлить рост образующихся нанокристаллитов, делая предпочтительной стадию их образования, что приводит к большему

размеру микросфер. Аналогичное явление наблюдалось при получении гибридных частиц ватерита с соосажденным альгинатом [117].

Анализ поведения частиц ватерита в суспензии (рН 7,0, 37°C) выявил полную перекристаллизацию микросфер ватерита СС в более термодинамически стабильный кальцит в течение 24 ч, в то время как гибридные микросферы ССМ оставались в ватеритной модификации и не агрегировали в течение 90 суток наблюдений, с совокупным высвобождением не более 20 % включенного муцина.

3.3.2.3. Использование муцина в послойной адсорбции полиэлектролитов

При послойной адсорбции муцина и протамина (дзета-потенциал в растворе +7 мВ) на микросферах ватерита СС и гибридных микросферах ССМ (рис. 3.84) происходила перезарядка поверхности частиц с отрицательной для гликопротеина на положительную для полипептида, что подтверждало образование комплекса между выбранными полиэлектролитами.

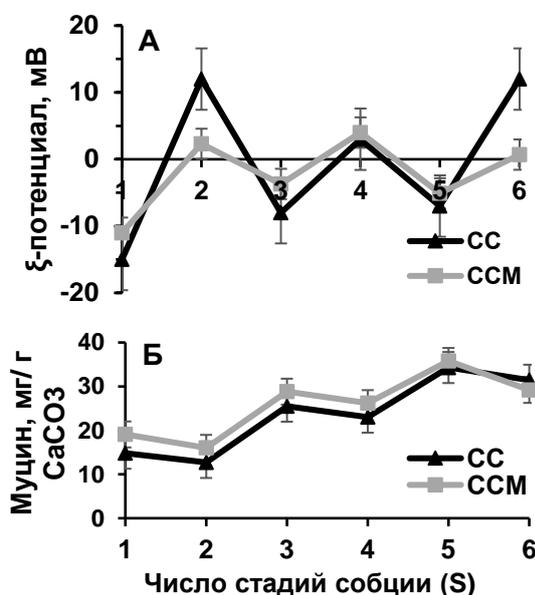


Рис. 3.84. Изменение ξ -потенциала частиц (А) и содержания муцина (Б) при послойной адсорбции протамина и муцина на микросферах ватерита СС и гибридных микросферах ССМ.

Количество связанного частицами муцина (рис. 3.84 Б) возрастало на стадии сорбции муцина и незначительно уменьшалось при сорбции протамина, что хорошо согласовывалось с данными по частичному вытеснению муцина с плоских поверхностей при адсорбции других поликатионов (ПАА [186], хитозана [388] и лактопероксидазы [185, 187]).

После 4 - 6 стадий адсорбции муцина и протамина на микросферах ватерита и растворения карбонатной матрицы с помощью ЭДТА удалось получить стабильные микрокапсулы (М-Пр)₂₋₃, в отличие от эксперимента с проведением ступенчатой адсорбции одного гликопротеина (рис. 3.79).

При включении каталазы и аprotинина сорбцией в готовые мультислойные микрокапсулы (М-Пр)₂М (табл. 3.33) с отрицательно заряженной поверхностью было продемонстрировано высокое сохранение активности иммобилизованных белков, что хорошо согласовывалось со свойствами микрокапсул (ДС-Пр)₂ДС (табл. 3.29), сформированных с использованием высокомолекулярного декстрансульфата.

Таблица 3.33. Включение белка в готовые полые микрокапсулы (М-Пр)₂М (рН 7)

Белок	Содержание белка, мг/г частиц	Сохранение удельной активности иммобилизованного белка, %
Каталаза	67±8	100±8
Апротинин	180±10	102±6

3.3.3. Гибридные микросферы ватерита с муцином

3.3.3.1. Влияние муцина на включение лекарственных веществ в гибридные микросферы

Особые свойства гибридным микросферам ССМ придает присутствие муцина (рI 3 - 4), который в физиологических условиях способен за счет электростатических, водородных и гидрофобных связей образовывать комплексы с веществами различной природы (рис. 3.85).

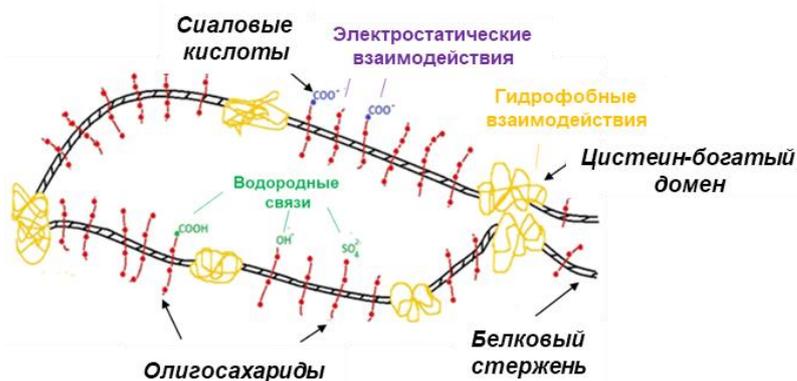


Рис. 3.85 Структура муцина из желудка свиньи и области возможного комплексообразования.

Для изучения включения в гибридные микросферы ССМ в 0,05 М трис-буфере с рН 7,0 путем совместного соосаждения с муцином были выбраны низкомолекулярные лекарственные вещества: инсулин (5,8 кДа, рI 5,3), аprotинин (6,5 кДа, рI 10,5) и антрациклиновый антибиотик доксорубин (544 Да, рКа 8,6, рис. 1.17), с гидродинамическими диаметрами соответственно 5,1 нм (гексамер) [369], 2,9 нм [372] и 0,5 нм [389]. На включение отрицательно заряженного инсулина наличие муцина не оказывало влияния (рис. 3.86 А). Аprotинин и доксорубин, имеющие соответственно положительный и слабо положительный суммарный заряд, включались в гибридные микросферы ССМ в больших количествах, чем в микросферы ватерита СС. Изучение высвобождения соединений из гибридных микросфер ССМ при рН 7,4 не выявило влияния муцина на выделение инсулина, но показало достоверное замедление выделения аprotинина и

доксорубицина (рис. 3.86 Б) по сравнению с микросферами ватерита СС. Апротинин при высвобождении из частиц полностью сохранял ингибирующую активность.

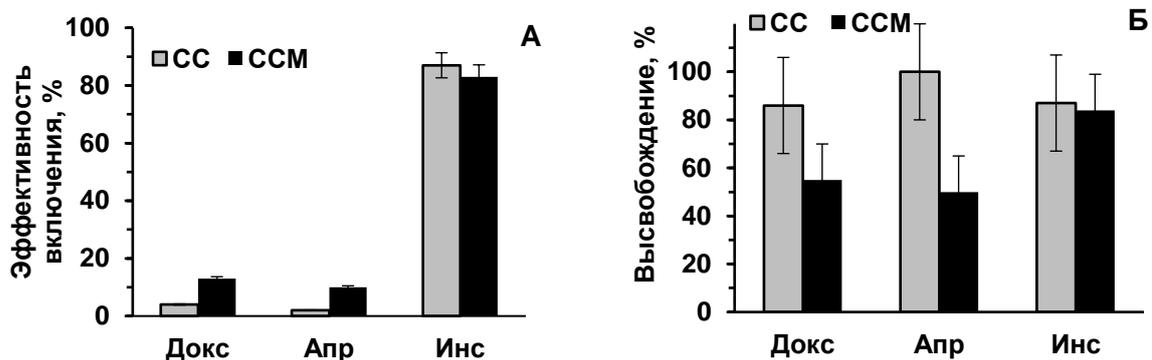


Рис. 3.86. Влияние присутствия муцина (1 мг/мл) на включение соосаждением (А) в микросферы ватерита СС и гибридные микросферы ССМ, высвобождение (Б) из микросфер доксорубицина, апротинина и инсулина. Условия: при включении - белки 1 мг/мл, доксорубицин 0,1 мг/мл, 0,05 М трис-буфер, рН 7,0; при высвобождении - 0,05 М трис-буфер, рН 7,4, 24 ч.

Увеличение включения и удерживания в микросферах ССМ положительно заряженных лекарственных веществ происходило за счет комплексообразования с отрицательно заряженным гликопротеином, что было продемонстрировано ИК-спектроскопией с использованием доксорубицина, полосы поглощения которого (рис. 3.87 Б) в малой степени перекрывались с полосами поглощения муцина 1060-1090 cm^{-1} (рис. 3.87 А).

При изучении образования комплексов муцина и доксорубицина регистрировали ИК-спектры растворов, в которых концентрацию муцина поддерживали постоянной (3 мг/мл), а концентрацию доксорубицина варьировали. Увеличение содержания антибиотика в системе приводило к значительному воспроизводимому увеличению интенсивности полосы поглощения С-О-С-связи с последующим выходом на плато (рис. 3.87 В). Учитывая вычитание спектра фоновых растворов доксорубицина, содержащих фрагмент сахара, с аналогичными концентрациями, спектральные изменения могут быть связаны со значительными трансформациями в микроокружении пиранозных циклов муцина. Можно предположить, что комплексообразование обусловлено взаимодействием сиаловых кислот в муцине с аминогруппами доксорубицина и гидрофобными взаимодействиями между антрациклиновым ядром доксорубицина и цистеин-богатыми доменами муцина (рис. 3.87), что сопровождается изменением микроокружения сахарного фрагмента и, соответственно, интенсивности полосы С-О-С.

С увеличением концентрации муцина при формировании микросфер наблюдалось возрастание включения доксорубицина (рис. 3.88 А), уменьшение высвобождения гликопротеина

и доксорубина (рис. 3.88 В), а также замедление перекристаллизации ватерита в кальцит (рис. 3.88 Б). При концентрации гликопротеина во время соосаждения 4 мг/мл и выше перекристаллизация микросфер ССМ вообще не происходила.

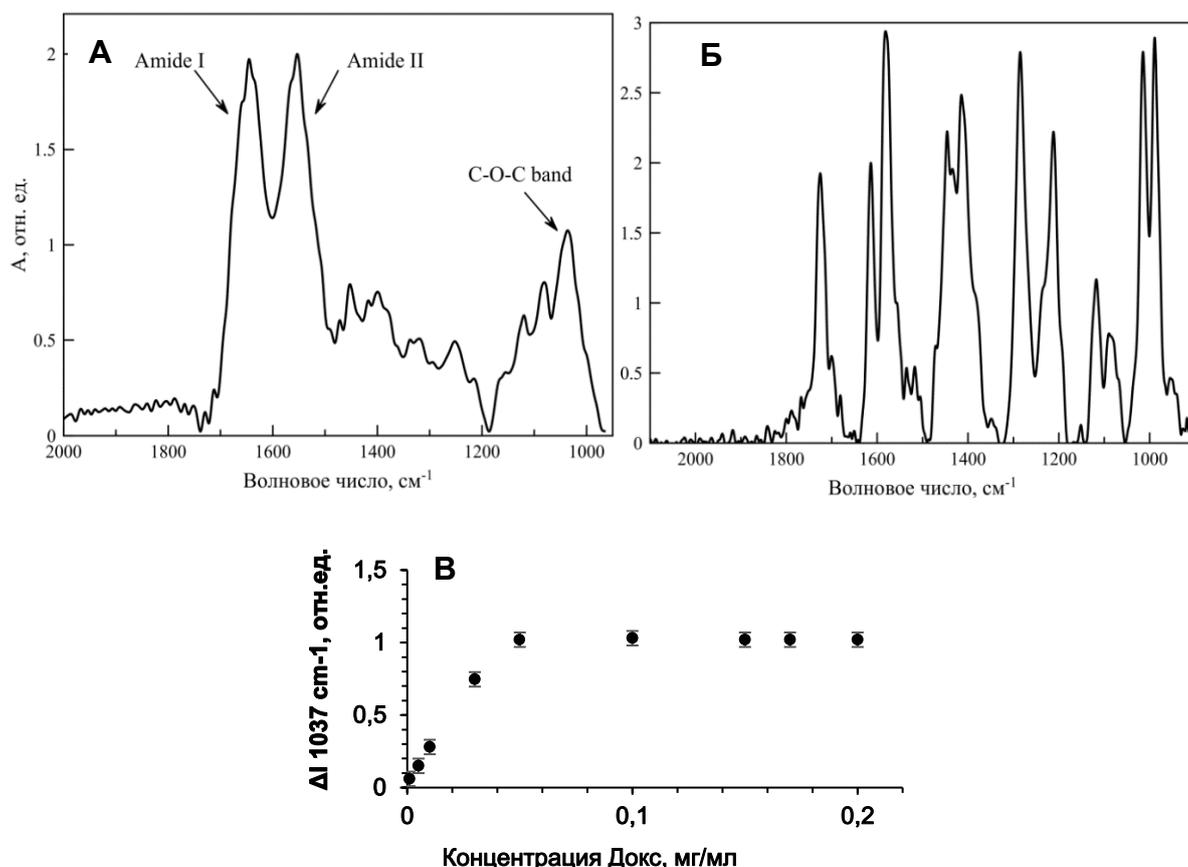


Рис. 3.87. А, Б - Нормализованные ИК-спектры муцина 3 мг/мл (А) и доксорубина 0,1 мг/мл (Б) в трис-буфере, рН 7,1, 22°C. В - Зависимость интенсивности полосы С-О-С-связи 1037 см⁻¹ по данным ИК-спектроскопии от концентрации доксорубина при постоянной концентрации муцина 3 мг/мл.

Скорость высвобождения муцина из гибридных микросфер ССМ замедлялась с увеличением его концентрации при соосаждении (рис. 3.89 А). В течение первых 5 ч инкубации наблюдалось значительное уменьшение высвобождения антибиотика из микросфер ССМ, мало зависящее от концентрации гликопротеина, но через 24 ч инкубации влияние концентрации муцина на уменьшение высвобождения доксорубина было более выраженным, что связано с существенным замедлением перекристаллизации ватерита в кальцит.

Таким образом, концентрация гликопротеина при получении микросфер ССМ может быть регулятором эффективности включения низкомолекулярных положительно заряженных соединений, а также их высвобождения и перекристаллизации частиц в кальцит (рис. 3.89 Б). Указанные свойства делают гибридные микросферы ватерита с муцином, даже без нанесения полиэлектролитных слоев, перспективными для использования в качестве контейнеров для пролонгированной доставки лекарственных веществ.

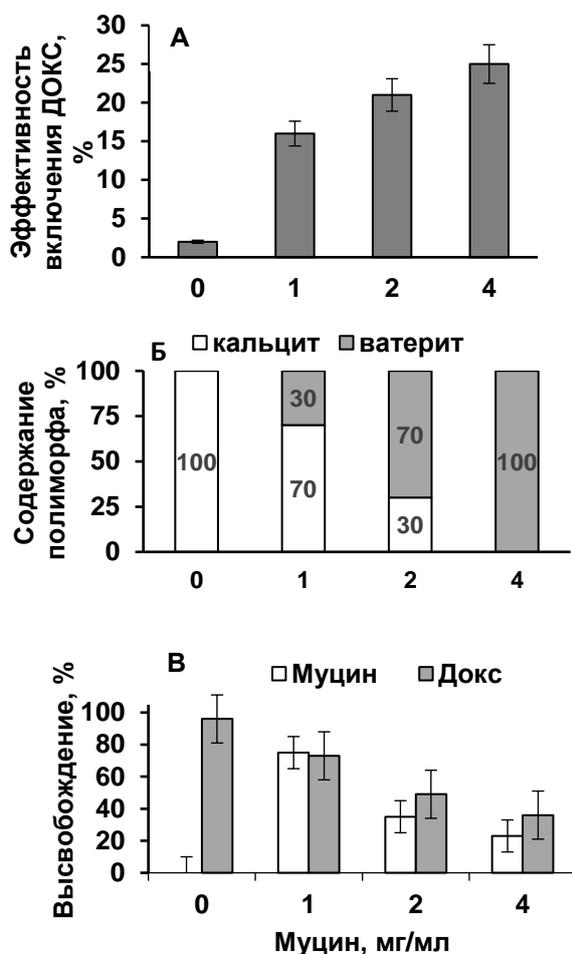


Рис. 3.88. Влияние концентрации муцина при соосаждении на включение доксорубина в микросферы ССМ (А), изменение полиморфной модификации частиц (Б) и высвобождение компонентов после 24 ч инкубации при pH 7,4 (В). Условия соосаждения - 0,05 М трис-буфер, 0,1 мг/мл доксорубина.

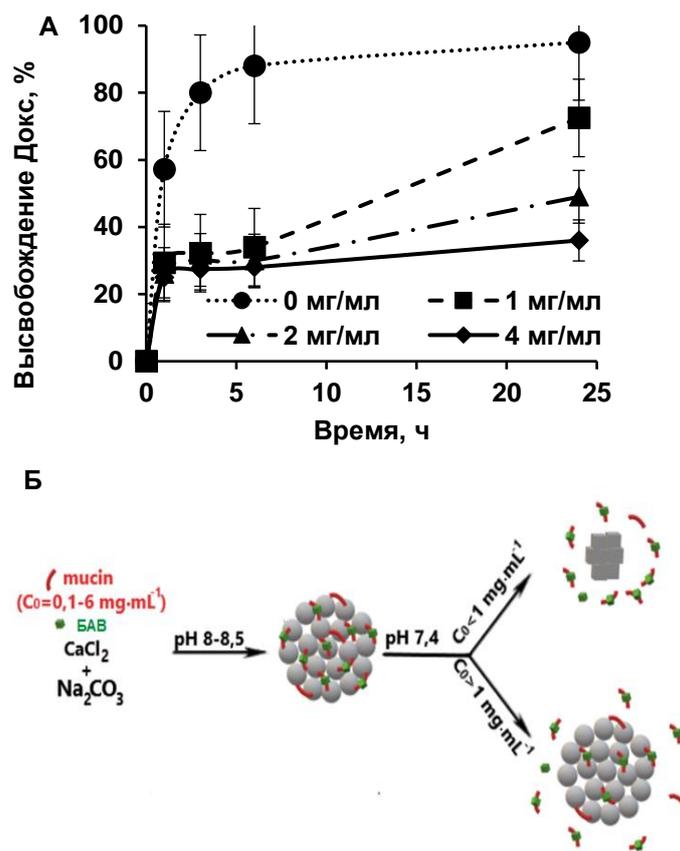


Рис. 3.89. Влияние концентрации муцина при соосаждении на кинетику высвобождения доксорубина из микросфер ССМ в 0,05 трис буфер, pH 7,4 (А). Б - схематическое изображение процесса включения и высвобождения БАВ из микросфер ССМ.

3.3.3.2. Иммобилизация ферментов в гибридные микросферы

При изучении иммобилизации в гибридные микросферы ССМ и микросферы ватерита СС химотрипсина и каталазы, на активность которых в растворах муцин не оказывал влияния, проводили сорбцию ферментов в трис-буфере с pH 7,0. Включение положительно заряженного химотрипсина (25 кДа, pI 8,8) в микросферы ССМ с отрицательным поверхностным зарядом было больше, чем в микросферы СС (табл. 3.34). Удельная активность иммобилизованного химотрипсина в гибридных микросферах ССМ-Хим оказалась ниже, чем в микросферах ватерита СС-Хим, что, по-видимому, связано с диффузионными затруднениями для субстрата, но в обоих случаях превышала активность фермента в растворе. Присутствие ионов Ca^{2+} в концентрации 10^{-2} М увеличивают активность химотрипсина в растворе на 20 %, однако концентрация катиона в

надосадочных растворах CaCO_3 , согласно произведению растворимости, на превышала $\sim 1,1 \cdot 10^{-4}$ М и не оказывала влияния на активность фермента. Можно предположить, что увеличение активности химотрипсина, иммобилизованного на ватерите, связано с активированием фермента ионами Ca^{2+} , находящимися не в растворе, а на поверхности микросфер.

Таблица 3.34. Характеристика сорбции химотрипсина (1 мг/мл) на гибридных микросферах ССМ и микросферах ватерита СС (40 мг/мл, рН 7)

Микросферы	ξ -потенциал, мВ	Размер пор, нм	Эффективность включения белка, %	Содержание белка, мг/г	Удельная активность иммобилизованного фермента*, %
СС	$0,5 \pm 1,6$	25 ± 5	19 ± 1	$4,7 \pm 0,2$	162 ± 11
ССМ	$-(7,0 \pm 0,6)$	8 ± 1	35 ± 1	$8,7 \pm 0,3$	118 ± 12

*За 100% принята активность химотрипсина в трис-буфере с рН 7,0.

Сорбцию высокомолекулярной каталазы (250 кДа, рI 5,4) со средним гидродинамическим диаметром молекулы 10,5 нм, близким к среднему диаметру пор гибридных микросфер (8 ± 1 нм), визуализировали с помощью КЛСМ (рис. 3.90). Отрицательно заряженная каталаза, меченная ФИТЦ, проникала только в наружную часть отрицательно заряженных гибридных микросфер ССМ (рис. 3.9 А, В), в отличие от распределения по всему объему в микросферах ватерита СС (рис. 3.56 Г, Д, Е). По-видимому, меньший размер пор микросфер ССМ и присутствие в порах одноименно заряженного муцина не позволяли ферменту попадать внутрь частиц.

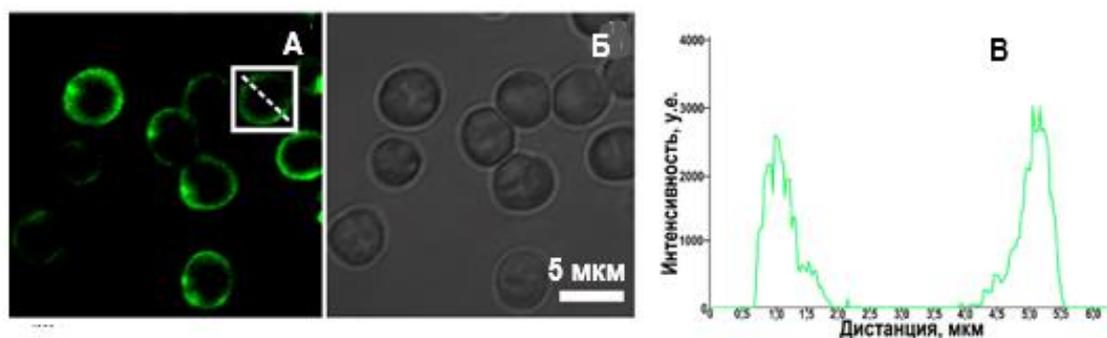


Рис. 3.90. КЛСМ фотографии адсорбции каталазы, меченной ФИТЦ, в гибридные микросферы ССМ: А - флуоресценция; Б - трансмиссия; В - профиль флуоресценции частицы на рис. А.

Содержание каталазы в микросферах возрастало с увеличением концентрации фермента, но во всех случаях в гибридные микросферы ССМ сорбировалось меньше фермента, чем в микросферы ватерита СС (табл. 3.35). Активность иммобилизованной каталазы уменьшалась с увеличением концентрации фермента в частицах, но в микросферах ССМ была меньше, чем в микросферах СС, что можно связать с дополнительными диффузными затруднениями для проникновения субстрата к ферменту, находящемуся в порах меньшего размера в присутствии гликопротеина.

Таблица 3.35. Влияние концентрации каталазы на сорбцию в гибридные микросферы ССМ и микросферы ватерита СС

Каталаза, мг/мл	Содержание белка, мг/г		Удельная активность иммобилизованного фермента, %	
	СС-Кат	ССМ-Кат	СС-Кат	ССМ-Кат
0,1	2,3±0,1	1,5±0,3	61±7	56±8
0,5	11,0±0,3	5,1±0,3	55±6	40±7
1,0	17,1±0,9	7,4±0,3	41±6	33±2

Дополнительный анализ параметров уравнения Михаэлиса-Ментен для зависимости скорости разложения каталазой пероксида водорода от концентрации субстрата (рис. 3.91, табл. 3.36) выявил для иммобилизованных ферментов уменьшение максимальной скорости реакции V_{\max} и константы Михаэлиса K_m ,

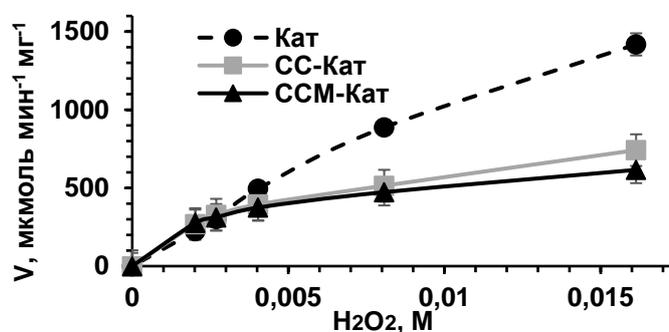


Рис. 3.91. Зависимость скорости разложения пероксида водорода каталазой в растворе и, иммобилизованной в гибридные микросферы ССМ и микросферы ватерита СС, от концентрации субстрата.

Таблица 3.36. Кинетические константы разложения пероксида водорода каталазой в растворе и, иммобилизованной в гибридные микросферы ССМ и микросферы ватерита СС

Препарат	Включение белка, мг/г		K_m , мМ	V_{\max} , мкмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹
	%	мг/г		
Каталаза	-	-	74,3±28,2	8599±1289
СС-Кат	77±2	19,3±5	4,4±1,7	853±186
ССМ-Кат	23±1	6,2±0,3	3,0±1,5	743±184

Причиной существенного падения V_{\max} могло быть более высокое локальное значение рН среды вблизи активного центра фермента, иммобилизованного в микросферы ватерита. Ввиду необратимости первой стадии разложения пероксида водорода каталазой объективная оценка уменьшения K_m затруднена.

При хранении суспензии микрочастиц с сорбированными ферментами ватеритная модификация гибридных микросфер ССМ не изменилась в течение 90 суток, а сохранение активности в течение 30 суток составило 81 и 79 % для химотрипсина и каталазы соответственно.

Изучение удерживания химотрипсина и каталазы в гибридных микросферах ССМ (рис. 3.92 А) при изменении рН среды в универсальном буфере показало, что высвобождение ферментов при рН 4 - 5 было небольшим, а с увеличением рН возрастало. Аналогичная зависимость наблюдалась и для муцина, высвобождение которого при рН 8 достигало 10 %.

Исследование кинетики высвобождения сорбированного химотрипсина в трис-буфере с рН 7,4 показало, что из гибридных микросфер ССМ-Хим и микросфер ватерита СС-Хим выделялось за 0,5 ч около 18 % белка, а далее этот параметр практически не изменялся течение 3 ч (рис. 3.92 Б). Через 24 ч микросферы ватерита СС-Хим полностью подверглись перекристаллизации в кальцит, обладающий низкой сорбционной емкостью для белков, а кумулятивное высвобождение ферментов достигало 50 - 60 %. Ватеритная полиморфная модификация гибридных микросфер ССМ-Хим за время наблюдений не изменялась, а высвобождение ферментов не увеличивалось.

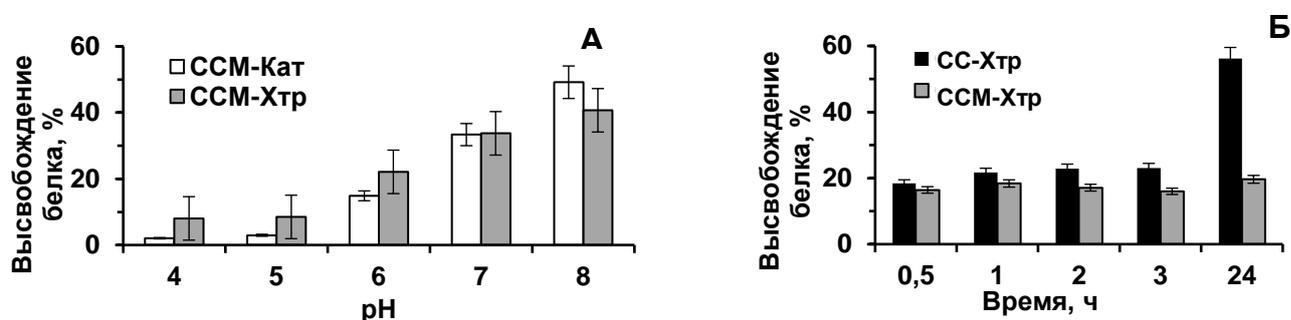


Рис. 3.92. Влияние рН (А) и времени инкубации при рН 7,4 (Б) на высвобождения сорбированных ферментов из гибридных микросфер ССМ и микросфер ватерита СС. Условия: 1 ч, 25 °С; А - универсальный буфер; Б - 0,05 М трис-буфер, рН 7,4.

Для каталазы проведено сравнение защитного действия микросфер ватерита от воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды (рис. 3.93): температуры (25 - 65 °С), органического растворителя (10 - 40 об. % ацетонитрила) и присутствия протеолитического фермента.

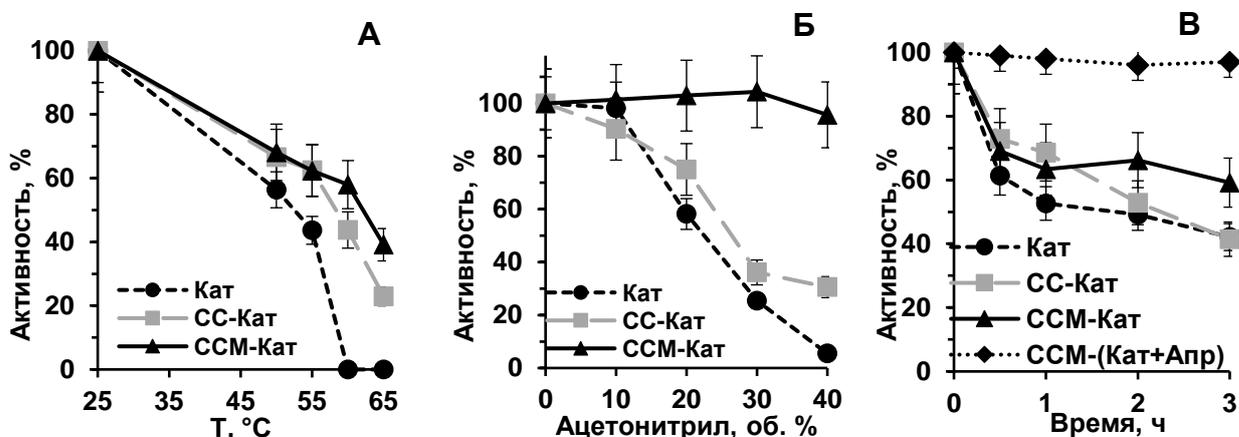


Рис. 3.93. Зависимость активности каталазы в растворе и сорбированной на гибридных микросферах ССМ и микросферах ватерита СС от температуры (А), концентрации ацетонитрила (Б) и времени инкубации с трипсином (мольное соотношение 5:1).

При температуре выше 60 °С каталаза в растворе полностью теряла активность, а потеря активности фермента в гибридных микросферах ССМ-Кат была меньше, чем в контрольных микросферах СС-Кат (рис. 3.93 А). При концентрации ацетонитрила 40 % фермент инактивировался полностью в растворе, на 70 % в микросферах СС-Кат, а в гибридных микросферах ССМ-Кат сохранял активность при всех концентрациях органического растворителя (рис. 3.93 Б).

Протеолиз каталазы вызывали инкубацией с трипсином (рис. 3.93 В). После 2 ч инкубации сохранение активности каталазы в микросферах ССМ-Кат было более высоким, чем в микросферах СС-Кат и в растворе. Следует заметить, что адсорбция на гибридных микросферах одновременно с каталазой ингибитора протеолитических ферментов апротинина (мольное соотношение 10:1) позволило полностью защитить иммобилизованный фермент.

Таким образом, сорбция на гибридных микросферах ватерита ССМ позволяла иммобилизовать ферменты без использования органических растворителей и сшивающих агентов, а их удельная активность возрастала с уменьшением концентрации адсорбированного белка. Гибридные частицы с муцином защищали ферменты от действия неблагоприятных фактов окружающей среды.

Указанные свойства делают гибридные микросферы с муцином ССМ удобными матрицами для включения положительно заряженных БАВ любой природы и последующей адсорбции полиэлектролитов, а также, даже без нанесения полимерных слоев, для непосредственного использования в качестве контейнеров для мукозальной доставки лекарственных веществ и создания комплексных препаратов, содержащих одновременно белковые препараты, антибиотики или противомикробные вещества.

3.3.4. Исследование цитотоксичности и биологической активности микросфер ватерита

Для сравнения биосовместимости гибридных микросфер ватерита с муцином ССМ и микросфер ватерита СС изучали взаимодействие с белками плазмы крови и повреждение мембран эритроцитов, а биологическую активность оценивали по образованию активных форм кислорода нейтрофилами.

3.3.4.1. Взаимодействие с белками крови

Проведено сравнение сорбции на гибридных микросферах ватерита ССМ и микросферах ватерита СС человеческого сывороточного альбумина (А, 68 кДа, рI 4,7), молекула которого имеет эллипсоидную форму с диаметром 3,8 нм и длиной 15 нм [390]. Связывание альбумина на частицах возрастало в течение 2 ч, а далее выходила на плато, но на гибридных микросферах ССМ было существенно меньше, чем на микросферах ватерита СС (рис. 3.94 А). На основании анализа изотерм адсорбции белка (рис. 3.94 Б) согласно уравнению Ленгмюра определены равновесные параметры (табл. 3.40).

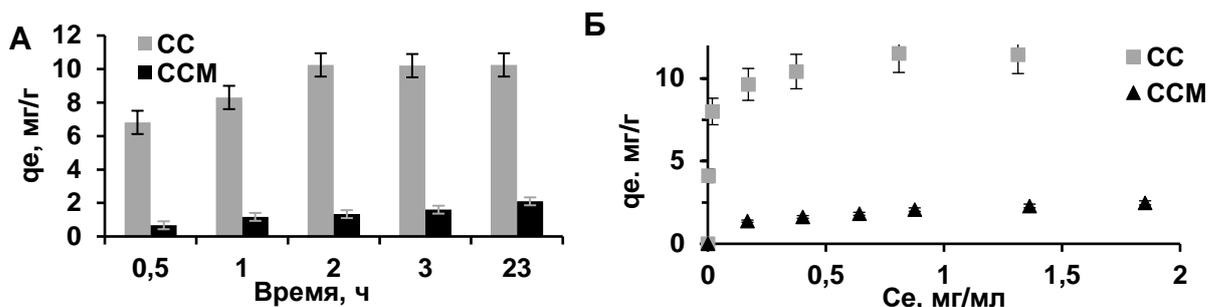


Рис. 3.94. Кинетика (А) и изотермы адсорбции (Б) человеческого сывороточного альбумина на гибридных микросферах ССМ и микросферах ватерита СС. Условия: 40 мг/мл частиц, 0,05 М трис-буфер, рН 7,4, 25°С; А - 1 мг/мл белка; Б - 2 ч.

Таблица 3.37. Характеристика сорбции человеческого сывороточного альбумина на гибридных микросферах ССМ и микросферах ватерита СС

Микросферы	ζ -потенциал, мВ	q_m , мг/г	K_a , M^{-1}	ΔG , кДж/моль
СС-А	-31 ± 1	$11,6 \pm 0,2$	$(3400 \pm 600) \cdot 10^3$	-37 ± 1
ССМ-А	-10 ± 1	$2,8 \pm 0,1$	$(260 \pm 50) \cdot 10^3$	-30 ± 1

Величина максимальной адсорбции альбумина на гибридных микросферах ССМ была в 4 раза меньше, чем на микросферах ватерита СС. Для частиц ССМ получено меньшее значение константы адсорбционного равновесия и соответственно большее значение свободной энергии Гиббса, что свидетельствовало о том, что альбумин имел меньшее сродство к поверхности гибридных микросфер с муцином.

Обработка альбумином в концентрации 30 мг/мл и плазмой крови по данным СЭМ, не оказывала существенного воздействия на размер и морфологию гибридных микросфер ССМ (рис. 3.95) и микросфер ватерита СС (рис. 3.96), а по данным ДЛС изменяла на отрицательный ζ -потенциал микросфер СС (рис. 3.97) и не влияла на слабо отрицательный поверхностный заряд микросфер ССМ.

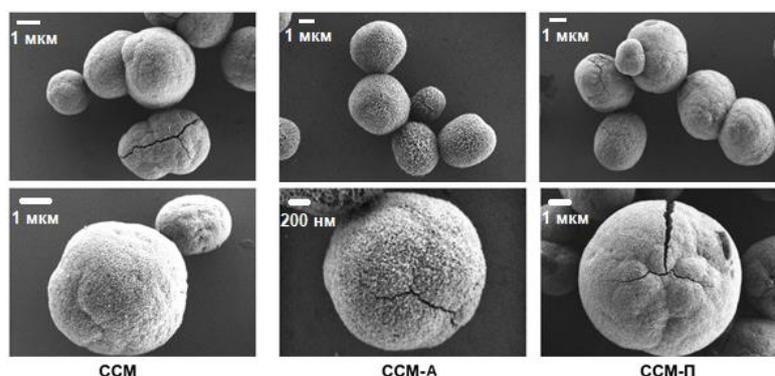


Рис. 3.95. СЭМ фотографии гибридных микросфер ватерита ССМ до и после взаимодействия с альбумином (ССМ-А) и плазмой крови (ССМ-П).

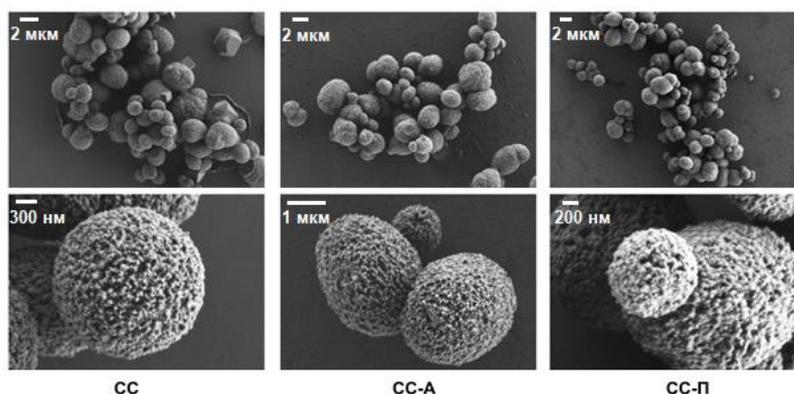


Рис. 3.96. СЭМ фотографии микросфер ватерита СС до и после взаимодействия с альбумином (СС-А) и плазмой крови (СС-П).

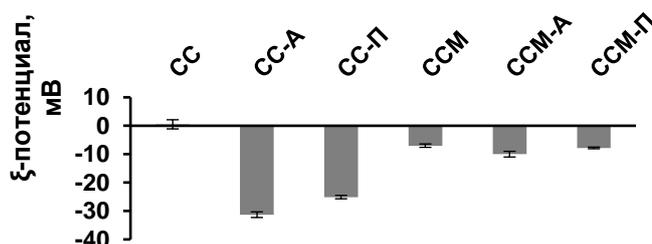


Рис. 3.97. Влияние адсорбции альбумина (А) и плазмы крови (П) на изменение поверхностного заряда гибридных микросфер ССМ и микросфер ватерита СС.

Большее абсолютное значение отрицательного поверхностного заряда микросфер СС-А по сравнению ССМ-А хорошо согласовывалось с данными о большей адсорбции альбумина на микросферах ватерита СС по сравнению с гибридными микросферами ССМ (табл. 3.37).

3.3.4.2. Лизис эритроцитов

В качестве показателя цитотоксичности микросфер ватерита использовали гемолитическую активность [391]. Лизис оценивали по высвобождению гемоглобина при повреждении клеточных мембран эритроцитов (рис. 3.98).

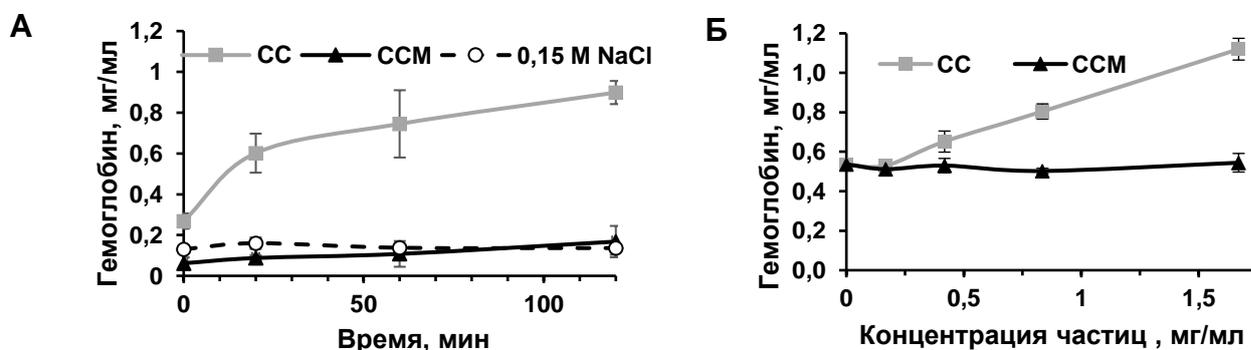


Рис. 3.98. Кинетика (А) и влияние концентрации гибридных микросфер ССМ и микросфер ватерита СС на лизис эритроцитов. При 100 % лизисе эритроцитов высвобождение гемоглобина составило 79 мг/мл. Условия: А - 1,5 мг/мл микросфер, Б - инкубация 2 ч, эритроциты $0,83-1,67 \cdot 10^9$ клеток/мл, 37°C, 0,15 М NaCl.

Даже при максимальном соотношении гибридных микросфер ССМ к клеткам 5:1 лизис эритроцитов, поверхность которых имеет заряд $-31,8 \pm 1,1$ мВ [140], отвечал уровню спонтанного гемолиза в растворе 0,15 М NaCl. Под действием микросфер ватерита СС лизис эритроцитов составил не более 1,6 % от полного гемолиза в воде. По данным Американского общества испытаний материалов ASTM степень лизиса эритроцитов менее 2 % считается негемолитической [392].

Исследовано влияние предварительной сорбции альбумина в интервале концентраций от 5 до 30 мг/мл (рис. 3.99) и плазмы (рис. 3.100) на микросферах на последующий лизис эритроцитов. Для микросфер ватерита СС предварительная сорбция альбумина, изменяющая поверхностный заряд частиц, уменьшала гемолиз до контрольных значений (рис. 3.99 Б). Адсорбция альбумина и плазмы на гибридных микросферах ССМ (рис. 3.99 А, 3.100) не влияла на отсутствие лизиса эритроцитов.

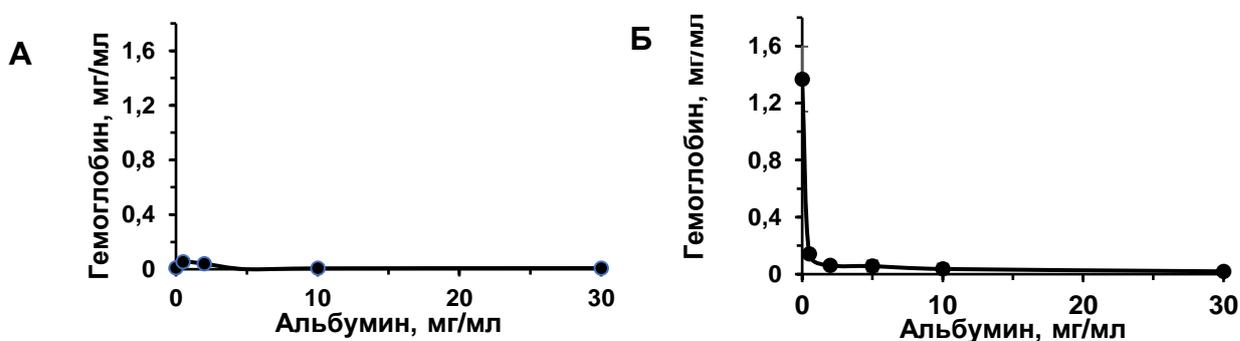


Рис. 3.99. Влияние концентрации альбумина при сорбции на гибридных микросферах ССМ (А) и на микросферах ватерита СС (Б) на лизис эритроцитов. Условия: частицы 1,5 мг/мл, эритроциты $0,83 - 1,67 \cdot 10^9$ клеток/мл, 30 мин, 37 °С, 0,15 М NaCl.

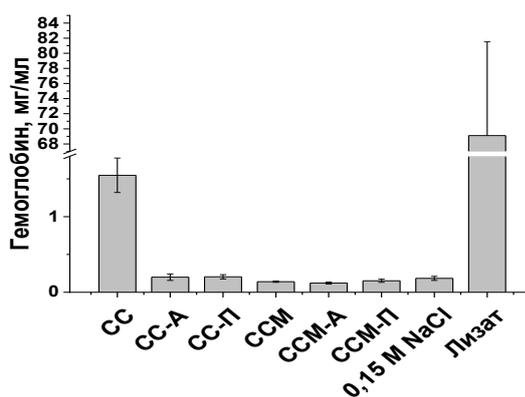


Рис. 3.100. Влияние предварительной обработки альбумином (А) и плазмой крови (П) гибридных микросфер ССМ и микросфер ватерита СС на лизис эритроцитов. Условия: концентрация частиц 1,67 мг/мл, эритроциты $0,83 - 1,67 \cdot 10^9$ клеток/мл, 37 °С, 2 ч, 0,15 М NaCl.

Таким образом, отрицательно заряженные гибридные микросферы с муцином ССМ до и после обработки альбумином и плазмой крови не вызвали разрушения мембран эритроцитов в исследованном диапазоне концентраций. Гемолитическая активность микросфер ватерита СС была дозозависимой, что хорошо соответствовало с данными, описанными для наносфер ватерита с гентамицином [134]. После адсорбции альбумина или белков плазмы на микросферах ватерита СС поверхностный заряд частиц изменялся на отрицательный, а гемолиза эритроцитов не наблюдалось. Полученные результаты позволили исключить прямое повреждение мембран клеток при воздействии гибридных микросфер ССМ.

3.3.4.3. Активация нейтрофилов

Биологическую активность микросфер ватерита оценивали по образованию активных форм кислорода нейтрофилами (рис. 3.101). Активацию нейтрофилов частицами анализировали хемилюминесценцией, образование супероксидного аниона радикала $O_2^{\cdot-}$ с помощью люцигенин-зависимой хемилюминесценции (Люц-ХЛ), а образование преимущественно гипохлорита ClO^- с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции (люм-ХЛ). Люминол- (рис. 3.101 А) и люцигенин- (рис. 3.101 Б) зависимая хемилюминесценция нейтрофилов на гибридные микросферы ССМ многократно превышала показатели микросфер ватерита СС (табл. 3.38) и увеличивалась с ростом концентрации частиц (рис. 3.102).

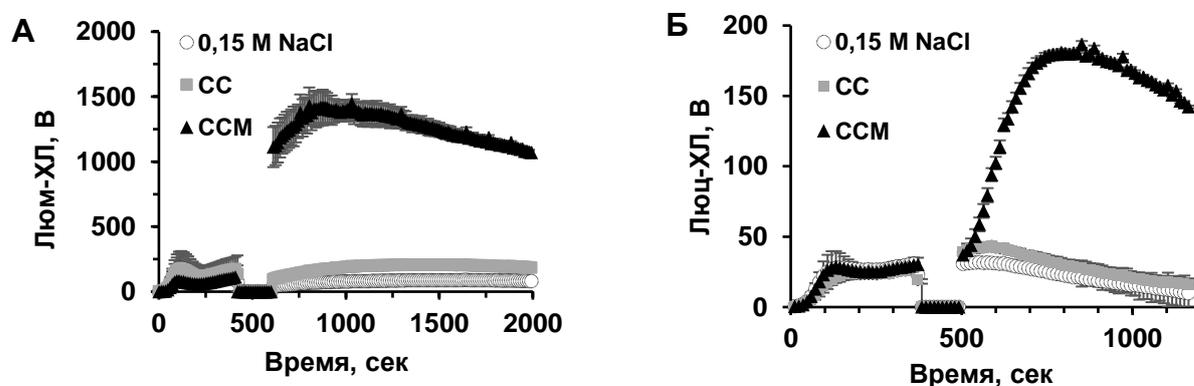


Рис. 3.101. Кинетика люминол- (А) и люцигенин-зависимой хемилюминесценции (Б) нейтрофилов, стимулированной гибридными микросферами ССМ и микросферами ватерита СС. Условия: частицы 1 мг/мл, нейтрофилы $0,5 \cdot 10^6$ клеток/мл, 0,15 М NaCl.

Таблица 3.38. Величина амплитуды хемилюминесценции нейтрофилов, стимулированной гибридными микросферами ССМ и микросферами ватерита СС (по данным рис. 3.101)

Образец	Δ Люм-ХЛ, В	Δ Люц-ХЛ, В
0,15 М NaCl	$91,4 \pm 13,6$	$1,3 \pm 1,1$
СС	$212,3 \pm 8,9$	$15,7 \pm 1,7$
ССМ	1462 ± 95	$160,3 \pm 5,6$

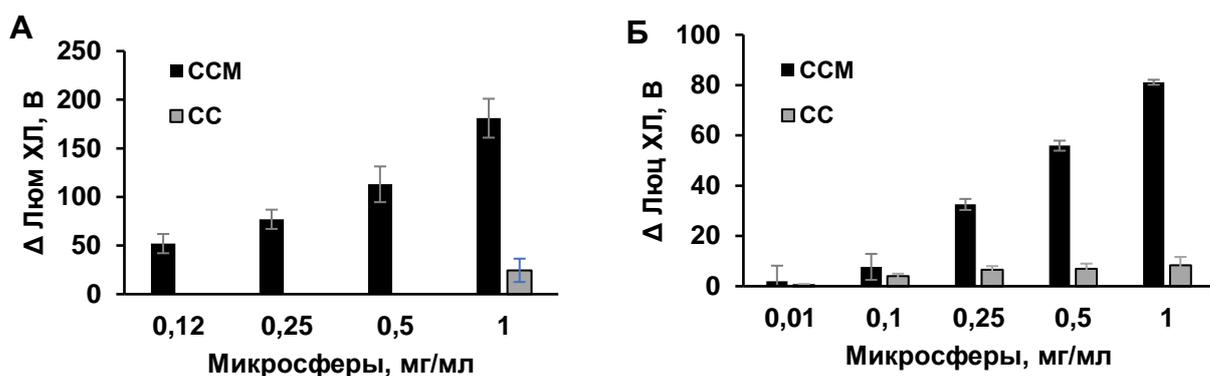


Рис. 3.102. Влияние концентрации гибридных микросфер ССМ и микросфер ватерита СС на величину амплитуды люцигенин (А)- и люминол (Б)-зависимой хемилюминесценцию нейтрофилов.

Дополнительная проверка влияния супернатантов от микросфер СС и ССМ не выявила активации нейтрофилов.

Различия в диаметре микросфер СС и ССМ могут сказываться на взаимодействии частиц с нейтрофилами [393], однако использование микросфер ватерита с сорбированным муцином СС-М также вызывало значительное усиление активации нейтрофилов, хотя и в меньшей степени, чем для частиц ССМ. Ранее аналогичные результаты были получены нами при сравнении активации нейтрофилов образцами наночастиц на основе фосфата кальция до и после адсорбции муцина [С5].

Предварительная адсорбция альбумина на микросферах ватерита СС-А снижала величину двух видов хемилюминесценции нейтрофилов, а на гибридных микросферах ССМ-А не влияла на величину люминол-зависимой хемилюминесценции и увеличивала величину люцигенин-зависимой хемилюминесценции (рис. 3.103).

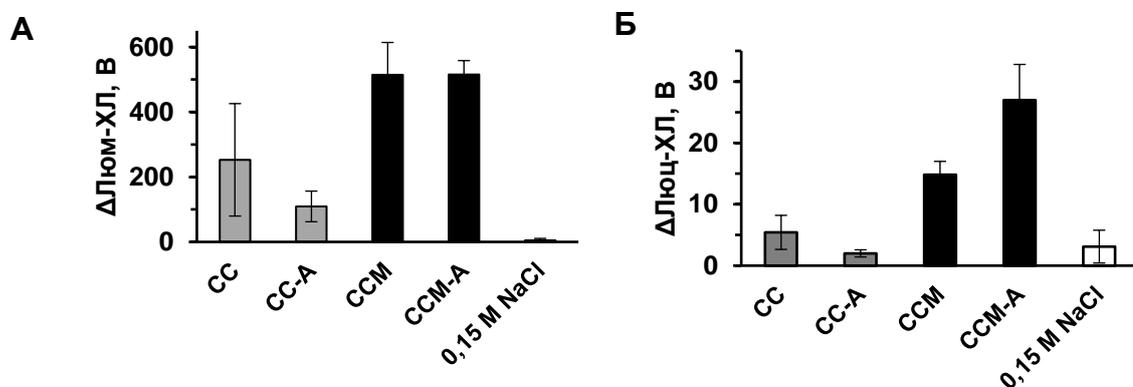
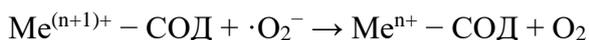


Рис. 3. 103. Люминол- (А) и люцигенин- (Б) зависимая хемилюминесценция нейтрофилов гибридными микросферами ССМ и микросферами ватерита СС до и после предобработки альбумином (ССМ-А и СС-А соответственно).

Люцигенин-зависимая хемилюминесценция позволяет оценивать образование супероксидного анион радикала, продуцируемого НАДФН-оксидазой нейтрофилов (рис.1.8). Сборка НАДФН-оксидазы под действием стимуляторов происходит на наружной и на внутренних мембранах нейтрофилов (в фагосомах). Люцигенин-зависимая хемилюминесценция позволяет регистрировать образование супероксидного радикала в обоих случаях, а добавление в систему супероксиддисмутазы должно приводить к снижению внеклеточной хемилюминесценции, за счет дисмутации продуцируемого вовне $O_2^{\cdot-}$:



Для анализа эффектов супероксиддисмутазу добавляли в пробы на максимуме люцигенин-зависимой хемилюминесценции и регистрировали ее снижение (рис. 3.104). После первой добавки фермента для гибридных микросфер ССМ уровень хемилюминесценции уменьшался до 38 % и не снижался при повторном добавлении фермента, что отражало вклад внеклеточной продукции супероксидного анион радикала.

Аналогично оценивали влияние каталазы на величину люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов, активированных гибридными микросферами ССМ (рис. 3.105). Каталаза снижала люминол-зависимый хемилюминесцентный ответ более чем на 50 %, что свидетельствовало о значительном вкладе продуцируемого внеклеточно пероксида водорода в люминольную хемилюминесценцию.

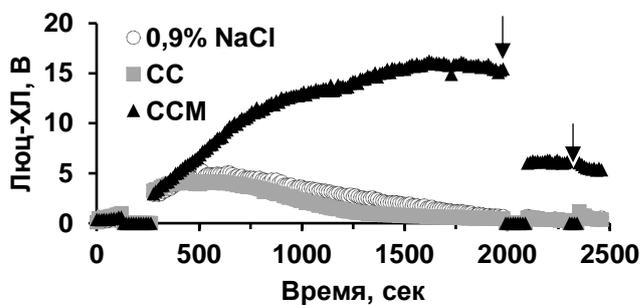


Рис. 3.104. Кинетика люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов, стимулированных гибридными микросферами ССМ и микросферами ватерита СС, при добавлении супероксиддисмутазы. Стрелками обозначено внесение фермента в пробы по 15 Ед/мл.

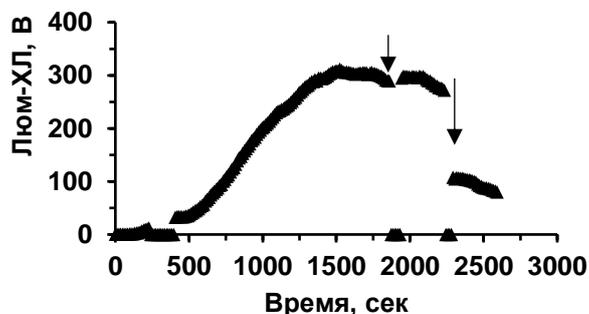


Рис. 3.105. Кинетика люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов, стимулированных гибридными микросферами ССМ, при добавлении каталазы. Стрелками обозначено внесение фермента в пробы по 20 и 400 Ед/мл.

Дополнительная оценка влияния растворенного муцина на процесс хемилюминесценции выявила, что добавление гликопротеина незначительно уменьшило величину люцигенин-зависимой хемилюминесценции в растворе 0,15 М NaCl, практически не влияло на активацию

микросферами ватерита СС, но увеличивало ответ гибридных микросфер ССМ (рис. 3.106). Эффект добавления муцина к микросферам с сорбированным альбумином был аналогичным.

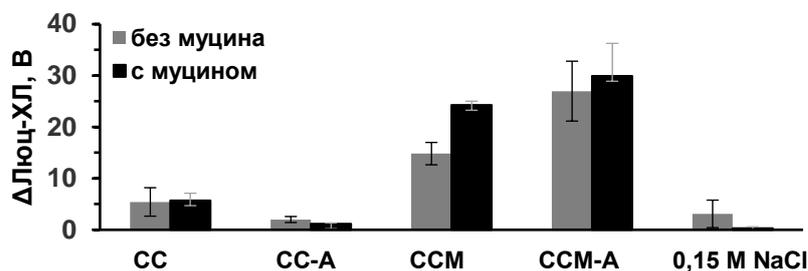


Рис. 3.106. Сравнение влияния добавления муцина (0,2 мг/мл) на люцигенин-зависимую хемилюминесценцию нейтрофилов, стимулированных гибридными микросферами ССМ и микросферами ватерита СС до и после предобработки альбумином.

Изучено поведение нейтрофилов после добавления микросфер ватерита на введение второго стимулятора форболмириостат-ацетата, использование которого могло бы выявить цитотоксичное действие частиц (рис. 3.107). Люминол-зависимая хемилюминесценция на добавление форболмириостат-ацетата после предварительной стимуляции гибридными микросферами ССМ была ниже, чем после предварительной стимуляции микросферами ватерита СС. Различия были вызваны тем, что гибридные частицы сами по себе вызывали более выраженный хемилюминесцентный ответ нейтрофилов, снижая тем самым их способность отвечать на второй стимулятор. Ответ нейтрофилов на введение второго стимулятора подтверждал жизнеспособность клеток после воздействия гибридных микросфер с муцином ССМ.

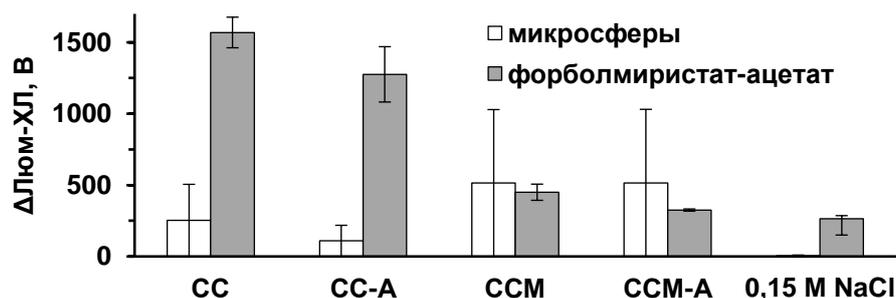


Рис. 3.107. Величина люминол-зависимой хемилюминесценции при последовательной стимуляции нейтрофилов гибридными микросферами ССМ или микросферами ватерита СС и форболмириостат-ацетатом.

Значительное увеличение люминол-зависимого хемилюминесцентного ответа при активации нейтрофилов гибридными микросферами ССМ является, главным образом, результатом образования гипохлорита ClO₂. Известно, что обработка муцина гипохлоритом натрия в течение нескольких минут разрушает белковый остов муцина с высвобождением углеводов

цепей [394]. Обработка гибридных микрочастиц ССМ с муцином раствором NaOCl снижала величину хемилюминесцентного ответа нейтрофилов в зависимости от его концентрации (рис. 3.108).

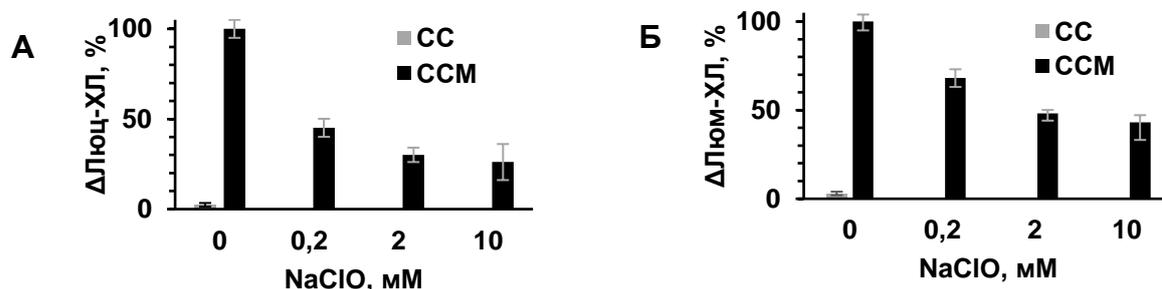


Рис. 3.108. Зависимость амплитуды люцигенин- (А) и люминол- (Б) зависимого хемилюминесцентного ответа нейтрофилов на гибридные микросферы ССМ и микросферы ватерита СС от концентрации гипохлорита натрия, использованного при их обработке. Концентрация частиц в пробах 1 мг/мл.

Анализ не выявил десорбции муцина с поверхности гибридных микрочастиц ССМ под действием гипохлорита натрия, поэтому можно предположить, что снижение хемилюминесцентного ответа обусловлено повреждением фрагментов муцина, в том числе, участвующих в адгезии и/или активации нейтрофилов. Следовательно, возможной мишенью продуцируемых нейтрофилами оксидантов является муцин, экспонированный на поверхности гибридных микросфер ССМ.

Таким образом, гибридные микросферы с муцином ССМ отличались от микросфер ватерита СС большей способностью стимулировать продукцию активных форм кислорода нейтрофилами крови человека *in vitro*. Поскольку супероксиддисмутаза и каталаза ингибировали более 50 % люцигенин- и люминол-зависимой хемилюминесценции, можно предположить, что хемилюминесценция была связана преимущественно с генерируемыми внеклеточно активными формами кислорода. Добавление муцина в среду измерений с гибридными микросферами ССМ не снижало уровень люцигенин-зависимой хемилюминесценции, что говорило об отсутствии прямого ингибирования муцином взаимодействия между нейтрофилами и частицами. Активация нейтрофилов при повторной стимуляции форболмирикат-ацетатом свидетельствовала о сохранении жизнеспособности клеток после воздействия гибридных микросфер ССМ и микросфер ватерита СС.

3.3.5. Выводы к разделу 3.3.

1. Впервые изучено взаимодействие муцина с микросферами ватерита. По результатам анализа сорбции гликопротеина оценены мукоадгезивные свойства частиц и перспективность их использования для мукозальной доставки.

2. Продемонстрировано использование муцина для получения на основе микросфер ватерита мультислойных микрокапсул.
3. При соосаждении муцина получены гибридные микросферы ватерита, обладающие по сравнению контрольными микросферами ватерита новыми свойствами: лучшей стабильностью, отрицательным поверхностным зарядом, существенно большей площадью поверхности, меньшими размерами нанокристаллитов и пор, что позволило эффективнее включать положительно заряженные белки и низкомолекулярные соединения. Гибридные микросферы с муцином характеризовались лучшим удерживанием включенных веществ, большим защитным действием по отношению к инаktivации иммобилизованных ферментов под действием неблагоприятных факторов и протеолиза. Концентрация муцина при формировании гибридных микросфер являлась регулятором эффективности включения и высвобождения лекарственных веществ за счет комплексообразования и влияния на перекристаллизацию в более термодинамически стабильный кальцит. Указанные свойства делают гибридные микросферы ватерита перспективными при использовании в качестве контейнеров для пролонгированной мукозальной доставки лекарственных веществ.
4. Исследование биосовместимости гибридных микросфер с муцином выявило меньшее связыванием белков плазмы крови, отсутствие разрушения мембран эритроцитов, а также большую способность стимулировать образование активных форм кислорода нейтрофилами по сравнению с контрольными микросферами ватерита.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проделанной работы было разработано направление, связанное с микрокапсулированием белков с использованием техники послойной адсорбции полиэлектролитов. Систематизированы, предложены, обоснованы и реализованы подходы к иммобилизации белковых препаратов с различными физико-химическими свойствами в мультислойные микрокапсулы с использованием наноструктурированных матриц для получения контейнеров с рН-чувствительным высвобождением белков и стабильных биореакторов с высоким сохранением активности иммобилизованных ферментов.

Послойная адсорбция полиэлектролитов на предложенных в работе матрицах в виде нерастворимого полиэлектролитного комплекса белка позволила капсулировать широкий круг белков с различными физико-химическими свойствами и получить стабильные мультислойные наноструктурированные микрочастицы неправильной формы размером 3 - 10 мкм, а после их обработки ультразвуком - наночастицы. Мультислойные частицы, полученные с использованием высокомолекулярных полиэлектролитов, обладали мукоадгезивными свойствами, рН-

чувствительностью к высвобождению белка и при отсутствии строгих требований к форме и размеру были перспективными для мукозальной, в том числе пероральной доставки.

При обращении к растворимым матрицам при послойной адсорбции полиэлектролитов необходимо рассматривать возможность образования как полых, так матричных мультислойных капсул, что приводит к различному распределению белка внутри частиц.

Применение меламинаформальдегидных сфер после нанесения полиэлектролитов и растворения матрицы не приводило к полному удалению продуктов деградации, поэтому были получены матричные капсулы с единой полимерной сетью. Включение высокомолекулярных белков и их удерживание в готовых матричных мультислойных капсулах, сохранение активности иммобилизованных оксидоредуктаз было высоким и зависело от pH среды. Капсулы оказались пригодными для создания мультиферментных каталитических систем с возможным использованием для аналитических целей.

Использование наноструктурированных, мезопористых микросфер ватерита позволило после растворения карбонатой матрицы получить полые полиэлектролитные микрокапсулы сферической формы, содержание в которых белков и проявление активности иммобилизованных ферментов зависело от их физико-химических свойств и способа включения белковых препаратов. При загрузке предварительным соосаждением в микросферы ватерита содержание белка в микрокапсулах было наиболее высоким, а активность иммобилизованных ферментов низкой из-за диффузионных затруднений для проникновения субстрата внутрь частиц. После предварительной адсорбции на микросферах ватерита содержание белка в капсулах уменьшалось, а активность иммобилизованных ферментов увеличилась. Наиболее высокой активности иммобилизованных ферментов удалось достичь при включении в готовые полые мультислойные капсулы, однако содержание белка в таких частицах было самым низким. Полиэлектролитные микрокапсулы с белками были стабильны в нейтральных средах.

Использование в работе муцина позволило впервые оценить мукоадгезивные свойства микросфер ватерита и полиэлектролитных частиц. Муцин был успешно использован в качестве полианиона при получении мультислойных полиэлектролитных капсул. Включение муцина соосаждением в микросферы ватерита позволило получить стабильные гибридные микросферы, обладающие большей площадью поверхности, меньшим размером пор и отрицательным зарядом, что позволило включать положительно заряженные белки и низкомолекулярные вещества, а также защитить иммобилизованные ферменты от неблагоприятных факторов окружающей среды.

ВЫВОДЫ

1. В результате систематических исследований обоснованы и реализованы подходы к капсулированию белковых препаратов с использованием микроматриц и послойной адсорбции полиэлектролитов. Показано, что основными факторами, влияющими на состав и свойства мультислойных частиц (содержание и сохранение биологической активности белков, стабильность и рН-чувствительность) являются природа и структура матрицы, условия формирования частиц, физико-химические свойства полиэлектролитов и белков, способы включения белков, количество полимерных слоев. Области возможного использования мультислойных частиц зависят от их стабильности, удерживания или пролонгированного высвобождения иммобилизованных белков и ферментов.
2. Разработан оригинальный метод получения стабильных микроматриц в виде высоленных микроагрегатов белка и нерастворимых полиэлектролитных микрокомплексов белка, характеризующихся высокими эффективностью включения и содержанием белка. Метод получения нерастворимых комплексов применим для широкого круга белков с различными изоэлектрическими точками и молекулярными массами, полианионов разнообразного строения и подходит для одновременного включения нескольких белковых препаратов, в том числе белковых ингибиторов протеаз. Полученные послойной адсорбцией полиэлектролитов на белковых матрицах микрочастицы характеризуются высоким содержанием (40 - 85%) и высокой удельной активностью (45 - 77 %) белка, являются наноструктурированными, а обработка ультразвуком позволяет их измельчить до стабильных частиц наноразмера.
3. На примере мультислойных микрочастиц, сформированных послойной адсорбцией высокомолекулярных декстрансульфата и хитозана на нерастворимых полиэлектролитных комплексах инсулина, выявлены многофункциональные свойства (рН-чувствительность, пролонгированное высвобождение белка, мукоадгезивность, защита от агрессивных сред и протеолиза), обеспечивающие повышение биодоступности микрокапсулированных белков при мукозальной доставке. Предложен общий принцип действия контейнеров в виде мультислойных частиц с белками при мукозальном, в том числе пероральном применении. Подтверждено гипогликемическое действие полиэлектролитных микрочастиц с инсулином при пероральном введении здоровым животным и животным с диабетом.
4. По результатам включения белков в матричные микрокапсулы, полученные послойной адсорбцией полиэлектролитов на меламинаформальдегидных ядрах, показано высокое сохранение активности иммобилизованных ферментов и продемонстрирована возможность создания мультиферментных каталитических систем.
5. На основании анализа загрузки белков с различными изоэлектрическими точками и молекулярными массами в наноструктурированные микросферы ватерита с помощью методов

адсорбции и соосаждения предложены механизмы включения белков в частицы и их пролонгированного высвобождения, рекомендованы условия, позволяющие повысить содержание белковых препаратов и сохранение активности рН-чувствительных ферментов.

6. Проведено сравнение различных путей включения ферментов в полые микрокапсулы, полученные на микросферах ватерита послойной адсорбцией полиэлектролитов и растворением карбонатной матрицы, и разработана стратегия микрокапсулирования для достижения максимального содержания белка и сохранения активности иммобилизованных рН-чувствительных ферментов.

7. Предложено использование муцина для включения в микросферы ватерита и в качестве полианиона для послойной адсорбции полиэлектролитов. По результатам адсорбции муцина показаны высокие мукоадгезивные свойства микросфер ватерита. При послойной адсорбции с использованием муцина на микросферах ватерита получены стабильные мультислойные микрокапсулы перспективные для мукозальной доставки.

8. Соосаждением муцина при формировании ватерита синтезированы гибридные микросферы, обладающие повышенной стабильностью, лучшим включением и пролонгированным высвобождением положительно заряженных белков и биологически активных веществ, которые регулируются концентрацией биополимера. Исследование биосовместимости гибридных микросфер выявило отсутствие разрушения мембран эритроцитов и большую способность стимулировать образование активных форм кислорода нейтрофилами по сравнению с контрольными микросферами ватерита.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Iler R.K. Multilayers of colloidal particles // *J. Colloid Interface Sci.* 1966. V. 21. P. 569-594.
2. 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. V. 210. P. 831-835.
3. Decher G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites // *Science* 1997. V. 277. P. 1232-1237.
4. Mateos-Maroto A., Abelenda-Núñez I., Ortega F., Rubio R.G., Guzmán E. Polyelectrolyte Multilayers on Soft Colloidal Nanosurfaces: A New Life for the Layer-By-Layer Method // *Polymers (Basel)* 2021. V. 13(8). 1221.
5. Vergaro V., Scarlino F., Bellomo C., Rinaldi R., Vergara D., Maffia M., Baldassarre F., Giannelli G., Zhang X., Lvov Y.M., Leporatt, S. Drug-loaded polyelectrolyte microcapsules for sustained targeting of cancer cells // *Adv. Drug Del. Rev.* 2011. V. 63. P. 847-864.
6. Ai H., Jones S.A., Lvov Y.M. Biomedical Applications of Electrostatic Layer-by-Layer Nano-Assembly of Polymers, Enzymes, and Nanoparticles // *Cell Biochemistry and Biophysics* 2003. V. 39. P. 23-43.
7. Kharlampieva E., Kozlovskaya V., Sukhishvili S.A. Layer-by-Layer Hydrogen-Bonded Polymer Films: From Fundamentals to Applications // *Adv. Mater.* 2009. V. 21. P. 3053-3065.
8. Izumrudov V.A., Mussabayeva B.K., Murzagulova K.B. Polyelectrolyte multilayers: preparation and applications // *Russ. Chem. Rev.* 2018. V. 87. P. 192-200.
9. Volodkin D.V., Petrov A.I., Prevot M., Sukhorukov G.B. Matrix Polyelectrolyte Microcapsules: New System for Macromolecule Encapsulation // *Langmuir* 2004. V. 20. P. 3398-3406.
10. Tong W., Gao C. Multilayer microcapsules with tailored structures for bio-related applications // *J. Mater. Chem.* 2008. V. 18. P. 3799-3812.
11. Liang Z., Dzienis K.L., Xu J., Wang Q. Covalent Layer-by-Layer Assembly of Conjugated Polymers and CdSe Nanoparticles: Multilayer Structure and Photovoltaic Properties // *Adv. Funct. Mater.* 2006. V. 16. P. 542-548.
12. Saurer E.M., Flessner R.M., Buck M.E., Lynn D.M. Fabrication of covalently crosslinked and amine-reactive microcapsules by reactive layer-by-layer assembly of azlactone-containing polymer multilayers on sacrificial microparticle templates // *J. Mater. Chem.* 2011. V. 21. P. 1736-1745.
13. Johnston A.P.R., Mitomo H., Read E.S., Caruso F. Compositional and Structural Engineering of DNA Multilayer Films // *Langmuir* 2006. V. 22. P. 3251-3258.
14. Johnston A.P.R., Caruso F. Exploiting the Directionality of DNA: Controlled Shrinkage of Engineered Oligonucleotide Capsules // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007. V. 46. P. 2677-2680.

15. Van der Heyden A., Wilczewski M., Labbé P., Auzély R. Multilayer films based on host–guest interactions between biocompatible polymers // *Chem. Commun.* 2006. V. 30. P. 3220-3222.
16. Sato M., Sano M. Van der Waals Layer-by-Layer Construction of a Carbon Nanotube 2D Network // *Langmuir* 2005. V. 21. P. 11490-11494.
17. Duong D.L., Yun S.J., Lee Y.H. Van der Waals Layered Materials: Opportunities and Challenges // *ACS Nano* 2017. V. 11. P. 11803-11830.
18. Choudhary N., Chun, H.S., Kim J.H., Noh C., Islam M.A., Oh K.H., Coffey K., Jun Y., Jung Y. Strain-Driven and Layer-Number-Dependent Crossover of Growth Mode in van der Waals Heterostructures: 2D/2D Layer-By-Layer Horizontal Epitaxy to 2D/3D Vertical Reorientation // *Adv. Mater. Interfaces* 2018. V. 5. P. 1800382.
19. Kida T., Mouri M., Akashi M. Fabrication of Hollow Capsules Composed of Poly(methyl methacrylate) Stereocomplex Films // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006. V. 45. P. 7534-7536.
20. Serizawa T., Hamada K., Kitayama T., Fujimoto N., Hatada K., Akashi M. Stepwise Stereocomplex Assembly of Stereoregular Poly(methyl methacrylate)s on a Substrate // *J. Am. Chem. Soc.* 2000. V. 122. P.1891-1899.
21. Xiong Y., Steffen A., Andreas K., Müller S., Sternberg N., Georgieva R., Bäuml H. Hemoglobin-Based Oxygen Carrier Microparticles: Synthesis, Properties, and In Vitro and In Vivo Investigations // *Biomacromolecules* 2012. V. 13. P. 3292-3300.
22. Wang C., He C., Tong Z., Liu X., Ren B., Zeng F. Combination of adsorption by porous CaCO₃ microparticles and encapsulation by polyelectrolyte multilayer films for sustained drug delivery // *Int. J. Pharmaceutics* 2006. V. 308. P. 160-167.
23. Shi J., Zhang W., Wang X., Jiang Z., Zhang S., Zhang X., Zhang C., Song X., Ai Q. Exploring the Segregating and Mineralization-Inducing Capacities of Cationic Hydrophilic Polymers for Preparation of Robust, Multifunctional Mesoporous Hybrid Microcapsules // *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2013. V. 5. P. 5174-5185.
24. Kamba S.A., Ismail M., Hussein-Al-Ali S.H., Ibrahim T.A.T., Zakaria Z.A.B. In Vitro Delivery and Controlled Release of Doxorubicin for Targeting Osteosarcoma Bone Cancer // *Molecules* 2013. V. 18. P. 10580-10598.
25. Xu L. Sacrificial PSS-doped CaCO₃ templates to prepare chitosan capsules and their deformation under bulk pressure // *Polym. Bull.* 2013. V. 70. P. 455-465.
26. Kurapatia R., Raichur A.M. Composite cyclodextrin–calcium carbonate porous microparticles and modified multilayer capsules: novel carriers for encapsulation of hydrophobic drugs // *J. Mater. Chem. B.* 2013. V. 1. P. 3175-3184.

27. Pavlov A.M., Saez V., Cogley 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. V. 7. P. 4341-4347.
28. Byeon J.H. Photo-derived transformation from modified chitosan@calcium carbonate nanohybrids to nanosponges // *Scientific Reports* 2016. V. 6. 28782.
29. Timin A.S., Muslimov A.R., Petrova A.V., Lepik K.V., Okilova M.V., Vasin A.V., Afanasyev B.V., Sukhorukov G.B. Hybrid inorganic-organic capsules for efficient intracellular delivery of novel siRNAs against influenza A (H1N1) virus infection // *Scientific Reports* 2017. V. 7. 102.
30. 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. V. 13(1). 30.
31. Donath E., Sukhorukov G.B., Caruso F., Davis S.A., Möhwald H. Novel hollow polymer shells by colloid-templated assemble of polyelectrolytes // *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998. V. 37. P. 2201-2205.
32. Caruso F., Caruso R.A., Möhwald H. Nanoengineering of Inorganic and Hybrid Hollow Spheres by Colloidal Templating // *Science* 1998. V. 282. P. 1111-1114.
33. Peyratout C., Dahne L. Tailor-Made Polyelectrolyte Microcapsules: From Multilayers to Smart Containers // *Angew. Chem.* 2004. V. 43(29). P. 3762-3783.
34. Vikulina A.S., Campbell J. Biopolymer-Based Multilayer Capsules and Beads Made via Templating: Advantages, Hurdles and Perspectives // *Nanomaterials (Basel)* 2021. V. 11(10). 2502.
35. Vikulina A., Voronin D., Fakhrullin R., Vinokurov V., Volodkin D. Naturally derived nano- and micro-drug delivery vehicles: halloysite, vaterite and nanocellulose // *New J. Chem.* 2020. V. 44 (15). P. 5638-5655.
36. Trofimov A.D., Ivanova, A. A., Zyuzin M. V., Timin A. S. Porous Inorganic Carriers Based on Silica, Calcium Carbonate and Calcium Phosphate for Controlled/Modulated Drug Delivery: Fresh Outlook and Future Perspectives // *Pharmaceutics* 2018. V. 10 (4). 167.
37. Lederer F.L., Günther T.J., Weinert U., Raff J., Pollmann K. Development of Functionalised Polyelectrolyte Capsules Using Filamentous *Escherichia Coli* Cells // *Microb. Cell Fact.* 2012. V. 11. 163.
38. Estrela-Lopis I., Leporatti S., Typlt E., Clemens D., Donath E. Small Angle Neutron Scattering Investigations (SANS) of Polyelectrolyte Multilayer Capsules Templated on Human Red Blood Cells // *Langmuir* 2007. V. 23. P. 7209-7215.
39. Sakr O.S., Jordan O., Borchard G. Sustained protein release from hydrogel microparticles using layer-by-layer (LbL) technology // *Drug Deliv.* 2016. V. 23(8). P. 2747-2755.

40. Gao C.Y., Moya S., Lichtenfeld H., Casoli A., Fiedler H., Donath E. The decomposition process of melamine formaldehyde cores: the key step in the fabrication of ultrathin polyelectrolyte multilayer capsules // *Macromol. Mater. Eng.* 2001. V. 286. P. 355-361.
41. Volodkin D. CaCO₃ templated micro-beads and capsules for bioapplications // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2014. V. 206. P. 437-454.
42. Wu X., Song X., Li D., Liu J., Zhang P., Chen X. Preparation of mesoporous nano-hydroxiapatite using a surfactant template method for protein delivery // *J. Bionic Eng.* 2012. V. 9. P. 224-233.
43. Jin W., Shi X., Caruso F. High activity enzyme microcrystal multilayer films // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. V. 123. P. 8121-8122.
44. Lvov Y.M., Pattekari P., Zhang X., Torchilin V. Converting Poorly Soluble Materials into Stable Aqueous Nanocolloids // *Langmuir* 2011. V. 27(3). P. 1212-1217.
45. Shenoy D.B., Antipov A.A., Sukhorukov G.B., Möhwald H. Layer-by-Layer engineering of biocompatible, decomposable core-shell // *Biomacromol.* 2003. V. 4. P. 265-272.
46. Wu P., Sharma C.P. Ceramic drug delivery: a perspective // *J. Biomat. App.* 2003. V. 17. P. 253-260.
47. Gittins D.I., Caruso F. Tailoring the Polyelectrolyte Coating of Metal Nanoparticles // *J. Phys. Chem. B.* 2001. V. 105(29). P. 6846-6852.
48. Shchukin D.G., Patel A.A., Sukhorukov G.B., Lvov Y.M. Nanoassembly of biodegradable microcapsules for DNA encasing // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126(11). P. 3374-3375.
49. Volodkin D.V., Larionova N.I., Sukhorukov G.B. Protein encapsulation via porous CaCO₃ microparticles templating // *Biomacromolecules* 2004. V. 5. P. 1962-1972.
50. Sukhorukov G.B., Volodkin D.V., Gunther 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. V. 14. P. 2073-2081.
51. Vikulina A., Webster J., Voronin D., Ivanov E., Fakhrullin R., Vinokurov V., Volodkin D. Mesoporous additive-free vaterite CaCO₃ crystals of untypical sizes: From submicron to Giant // *Materials and Design* 2021. V. 197. 109220.
52. Roth R., Schoelkopf J., Huwyler J., Puchkov M. Functionalized calcium carbonate microparticles for the delivery of proteins // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018. V. 122. P. 96-103.
53. Kiryukhin M.V., Lim S.H., Lau H.H., Antipina M., Khin Y.W., Chia C.Y., Harris P., Weeks M., Berry C., Hurford D., Wallace O., Broadhurst M., Ridgway C.J., Schoelkopf J. Surface-reacted calcium carbonate microparticles as templates for lactoferrin encapsulation // *Colloid Interface. Sci.* 2021. V. 594. P. 362-371.
54. Becker A.L., Johnston A.P., Caruso F. Layer-by-layer-assembled capsules and films for therapeutic delivery // *Small* 2010. V. 6(17). P. 1836-1852.

55. Ariga K., Ji Q.M., Hill J.P. Enzyme-Encapsulated Layer-by-Layer Assemblies: Current Status and Challenges Toward Ultimate Nanodevices // *Adv. Polym. Sci.* 2010. V. 229. P. 51.
56. Wang Y., Hosta-Rigau L., Lomas H., Caruso F. Nanostructured polymer assemblies formed at interfaces: applications from immobilization and encapsulation to stimuli-responsive release // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011. V. 13(11). P. 4782-4801.
57. Boyjoo Y., Pareek V.K., Liu J. Synthesis of micro and nano-sized calcium carbonate particles and their applications // *J. Mater. Chem. A.* 2014. V. 2(35). P. 14270-14288.
58. Maleki Dizaj S., Barzegar-Jalali M., Zarrintan M.H., Adibkia K., Lotfipour F. Calcium carbonate nanoparticles as cancer drug delivery system // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2015. 12(10). 1649-1660.
59. Fadia P., Tyagi S., Bhagat S., Nair A., Panchal P., Dave H., Dang S., Singh S. Calcium carbonate nano- and microparticles: synthesis methods and biological applications // *3 Biotech.* 2021. V. 11(11). 457.
60. 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 // *Adv. Drug Del. Rev.* 2011. V. 63. P. 847-864.
61. Campbell J., Abnett J., Kastania G., Volodkin D., Vikulina A.S. Which Biopolymers Are Better for the Fabrication of Multilayer Capsules? A Comparative Study Using Vaterite CaCO₃ as Templates // *ACS Appl Mater Interfaces* 2021. V. 13(2). P. 3259-3269.
62. Marin E., Tapeinos C., Sarasua J.R., Larrañaga A. Exploiting the layer-by-layer nanoarchitectonics for the fabrication of polymer capsules: A toolbox to provide multifunctional properties to target complex pathologies // *Adv. Colloid. Interface Sci.* 2022. V. 304. 102680.
63. Lvov Y., Ariga K., Ichinose I., Kunitake T. Assembly of Multicomponent Protein Films by Means of Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117(22). P. 6117-6123.
64. Vander Straeten A., Lefèvre D., Demoustier-Champagne S., Dupont-Gillain C. Protein-based polyelectrolyte multilayers // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2020. V. 280. 102161.
65. Hong H., Murney R., Yakovlev N.L., Novoselova M.V., Hui S., Roy N., Singh H., Sukhorukov G.B., Haigh B., Kiryukhin M.V. Protein-Tannic Acid Multilayer Films: A Multifunctional Material for Microencapsulation of Food-Derived Bioactives // *J. Colloid Interface Sci.* 2017. V. 505. P. 332-340.
66. Kilic E., Novoselova M.V., Lim S.H., Pyataev N.A., Pinyaev S.I., Kulikov O.A., Sindeeva O.A., Mayorova O.A., Murney, R., Antipina M.N., Haigh B., Sukhorukov G.B., Kiryukhin M.V. Formulation for Oral Delivery of Lactoferrin Based on Bovine Serum Albumin and Tannic Acid Multilayer Microcapsules // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. 44159.
67. Novoselova M.V., Voronin, D.V., Abakumova, T.O., Demina P.A., Petrov A.V., Petrov V.V., Zatsypin T.S., Sukhorukov G.B. Focused Ultrasound-Mediated Fluorescence of Composite

- Microcapsules Loaded with Magnetite Nanoparticles: In Vitro and in Vivo Study // *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2019. V. 181. P. 680-687.
68. Tong W., Gao C., Möhwald H. pH-Responsive Protein Microcapsules Fabricated via Glutaraldehyde Mediated Covalent Layer-by-Layer Assembly // *Colloid. Polym. Sci.* 2008. V. 286. P. 1103-1109.
69. Caruso F., Schüler C. Enzyme Multilayers on Colloid Particles: Assembly, Stability, and Enzymatic Activity // *Langmuir* 2000. V. 16(24). P. 9595-9603.
70. Tiourina O.P., Sukhorukov G.B. Multilayer alginate/protamine microsized capsules: encapsulation of alpha-chymotrypsin and controlled release study // *Int. J. Pharm.* 2002. V. 242(1-2). P. 155-161.
71. Kolbe A., del Mercato L.L., Abbasi A.Z., Rivera Gil P., Gorzini S.J., Huibers W.H., Poolman B., Parak W.J., Herrmann A. De novo design of supercharged, unfolded protein polymers, and their assembly into supramolecular aggregates // *Macromol. Rapid. Commun.* 2011. V. 32(2). P. 186-190.
72. Zhao J., Cui Y., Wang A., Fei J., Yang Y., Li J. Side effect reduction of encapsulated hydrocortisone crystals by insulin/alginate shells // *Langmuir* 2011. V. 27(4). P. 1499-504.
73. Hou S., Wang J., Martin C. R. Template-synthesized protein nanotubes // *Nano Lett.* 2005. V. 5(2). P. 231-234.
74. Duan L., He Q., Yan X., Cui Y., Wang K.W., Li J. Hemoglobin protein hollow shells fabricated through covalent layer-by-layer technique. // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2007. V. 354(2). P. 357-362.
75. Qi W., Yan X., Duan L., Cui Y., Yang Y., Li J. Glucose-sensitive microcapsules from glutaraldehyde cross-linked hemoglobin and glucose oxidase // *Biomacromolecules* 2009. V. 10(5). P. 1212-1216.
76. Qi W., Duan L., Li J. Fabrication of glucose-sensitive protein microcapsules and their applications // *Soft. Matter.* 2011. V. 7(5). P. 1571-1576.
77. Hamid M., Rehman K., Chen S. Natural and Synthetic Polymers as Drug Carriers for Delivery of Therapeutic Proteins // *Polym. Rev.* 2015. V. 55. P. 371-406.
78. Silva J.M., Reis R.L., Mano J.F. Biomimetic Extracellular Environment Based on Natural Origin Polyelectrolyte Multilayers // *Small* 2016. V. 12. P. 4308-4342.
79. Mtibe A., Motlounge M.P., Bandyopadhyay J., Ray S.S. Synthetic Biopolymers and Their Composites: Advantages and Limitations. An Overview // *Macromol. Rapid Commun.* 2021. V. 42. 2100130.
80. Gopi S., Amalraj A., Sukumaran N.P., Haponiuk, J., Thomas S. Biopolymers and Their Composites for Drug Delivery: A Brief Review // *Macromol. Symp.* 2018. V. 380. 180014.
81. Delcea M., Möhwald H., Skirtach A.G. Stimuli-responsive LbL capsules and nanoshells for drug delivery // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2011. V. 63(9). P. 730-747.

82. Trushina D.B., Bukreeva T.V., Borodina T.N., Belova D.D., Belyakov S., Antipina M.N. Heat-driven size reduction of biodegradable polyelectrolyte multilayer hollow capsules assembled on CaCO₃ template // *Colloids Surf. B* 2018. V. 170. P. 312-321.
83. Trushina D., Bukreeva T., Khovankina A., Akasov R., Markvicheva E., Borodina T. Doxorubicin-loaded biodegradable capsules: temperature induced shrinking and study of cytotoxicity in vitro // *J. Mol. Liq.* 2019. V. 284. P. 215-224.
84. Lvov Y., Antipov A., Mamedov A., Möhwald H., Sukhorukov G. Urease encapsulation in nanoorganized microshells // *Nano Lett.* 2001. V. 1(3). P. 125-128.
85. Tiourina O.P., Antipov A.A., Sukhorukov G.B., Larionova N.I., Lvov Y., Möhwald H. Entrapment of alpha-chymotrypsin into hollow polyelectrolyte microcapsules // *Bioscience* 2001. V. 1 (5). P. 209-214.
86. Zhao Q., Li B. pH-controlled drug loading and release from biodegradable microcapsules // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2008. V. 4 (4). P. 302-310.
87. Itoh Y., Matsusaki M., Kida T., Akashi M. Locally controlled release of basic fibroblast growth factor from multilayered capsules // *Biomacromolecules* 2008. V. 9(8). P. 2202-2206.
88. Бобрешова М., Сухоруков Г.Б., Сабурова Е.А., Елфимова Л.И., Шабарчина Л.И., Сухоруков Б.И. Лактатдегидрогеназа в интерполиэлектролитном комплексе. Функция и стабильность // *Биофизика* 1999. V. 44(5). P. 813-20.
89. Caruso F., Trau D., Möhwald H., Renneberg R. Enzyme Encapsulation in Layer-by-Layer Engineered Polymer Multilayer Capsules // *Langmuir* 2000. V. 16(4) P. 1485-1488.
90. Dai Z., Heilig A., Zastrow H., Donath E., Möhwald H. Novel formulations of vitamins and insulin by nanoengineering of polyelectrolyte multilayers around microcrystals // *Chemistry* 2004. V. 10(24). P. 6369-6374.
91. Song L., Zhi Z.L., Pickup J.C. Nanolayer encapsulation of insulin-chitosan complexes improves efficiency of oral insulin delivery // *Int. J. Nanomedicine* 2014. V. 9. P. 2127-2136.
92. Petrov A. I., Volodkin D.V., Sukhorukov G. B. Protein-calcium carbonate coprecipitation: a tool for protein encapsulation // *Biotechnol. Prog.* 2005. V. 21(3). P. 918-925.
93. Beck R., Andreassen J.-P. Spherulitic Growth of Calcium Carbonate // *Cryst. Growth Des.* 2010. V. 10 (7). P. 2934-2947.
94. Parakhonskiy B.V., Haase A., Antolini R. Sub-micron vaterite containers: synthesis, substance loading, and release // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012. V. 51(5). P. 1195-1197.
95. Al Omari M.M. H., Rashid I.S., Qinna N.A., Jaber A.M., Badwan A.A. Calcium Carbonate // *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* 2016. V. 41. P. 131-132.
96. Singh A., Singh S.K. The impact of various drug ferrying additives on phase transitions behavior of Calcite, Vaterite and Aragonite // *Phase Transitions* 2019. V. 92 (11). P. 990-1008.

97. Konopacka-Lyskawa D. Synthesis Methods and Favorable Conditions for Spherical Vaterite Precipitation: A Review // *Crystals* 2019. V. 9(4). 223.
98. Ogino T., Suzuki T., Sawada K. The formation and transformation mechanism of calcium carbonate in water // *Geochimica et Cosmochimica Acta* 1987. V. 51. P. 2757-2767.
99. Brečević L., Nothig-Laslo V., Kralj D., Popović S. Effect of divalent cations on the formation and structure of calcium carbonate polymorphs // *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1996. V. 92. P. 1017-1022.
100. Sudareva N., O. Suvorova O., Saprykina N., Smirnova N., Bel'tyukov P., Petunov S., Radilov A., Vilesov A. Two-level delivery systems based on CaCO₃ cores for oral administration of therapeutic peptides // *J. Microencapsul.* 2018. V. 35. P. 619-634.
101. German S.V., Novoselova M.V., Bratashov D.N., Demina P.A., Atkin V.S., Voronin D.V., Khlebtsov B.N., Parakhonskiy B.V., Sukhorukov G.B., Gorin D.A. High-efficiency freezing-induced loading of inorganic nanoparticles and proteins into micron- and submicron-sized porous particles // *Sci. Rep.* 2018. V. 8(1). P. 17763.
102. De Temmerman M.-L., Demeester, J., De Vos F., De Smedt S.C. Encapsulation Performance of Layer-by-Layer Microcapsules for Proteins // *Biomacromolecules* 2011. V. 12. P. 1283-1289.
103. Mak W.C., Georgieva R., Renneberg R., Bäumlner H. Protein Particles Formed by Protein Activation and Spontaneous Self-Assembly // *Adv. Funct. Mater.* 2010. V. 20. P. 4139-4144.
104. Costa L.M.M., de Olyveira G.M., Salomão R. Precipitated calcium carbonate nano-microparticles: applications in drug delivery // *Adv. Tissue Eng. Regen. Med.* 2017. V. 3. P. 336-340.
105. Decllet A., Reyes E., Suárez O.M. Calcium carbonate precipitation: a review of the carbonate crystallization process and application in bioinspired composites // *Mater. Sci.* 2016. V. 44. P. 87-107.
106. Donatan S., Yashchenok A.M., Khan N., Parakhonskiy B., Cocquyt M., Pinchasik B.-E.S., Khalkenow D., Möhwald H., Konrad M., Skirtach A.G. The loading capacity versus the enzyme activity in new anisotropic and spherical vaterite microparticles // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2016. V. 8. P. 14284-14292.
107. Bäumlner H., Georgieva R. Coupled enzyme reactions in multicompartiment microparticles // *Biomacromolecules* 2010. V. 11(6). P. 1480-1487.
108. Munyemana J.C., He H., Fu C., Wei W., Tian J., Xiao J. A trypsin calcium carbonate hybrid nanosphere based enzyme reactor with good stability and reusability // *New J. Chem.* 2018. V. 42. P. 18388-18394.
109. Yang L., Guo Y., Ma X., Hu Z., Zhu S., Zhang X., Jiang K. Cooperativity between pepsin and crystallization of calcium carbonate in distilled water // *J. Inorg. Biochem.* 2003. V. 93 (3-4). P. 197-203.
110. Abalymov A., Van Poelvoorde L., Atkin V., Skirtach A.G., Konrad M., Parakhonskiy B. Alkaline Phosphatase Delivery System Based on Calcium Carbonate Carriers for Acceleration of Ossification // *ACS Appl. Bio Mater.* 2020. V. 3(5). P. 2986-2996.

111. Feoktistova N., Rose, J., Prokopović V. Z., Vikulina A. S., Skirtach A., Volodkin D. Controlling the vaterite CaCO₃ crystal pores. Design of tailor-made polymer-based microcapsules by hard templating // *Langmuir* 2016. V. 32. P. 4229-4238.
112. Трушина Д.Б., Сульянов С.Н., Букреева Т.В., Ковальчук М.В. Об управлении размером и структурных особенностях сферических частиц карбоната кальция // *Кристаллография* 2015. Т. 60(4). С. 625-633.
113. Trushina D.B., Bukreeva T.V., Antipina M.N. Size-Controlled Synthesis of Vaterite Calcium Carbonate by the Mixing Method: Aiming for Nanosized Particles // *Cryst. Growth Des.* 2016. V. 16(3). P. 1311-1319.
114. Liu Y., Chen Y., Huang X., Wu G. Biomimetic synthesis of calcium carbonate with different morphologies and polymorphs in the presence of bovine serum albumin and soluble starch // *Mat. Sc. and Eng.: C.* 2017. V. 79. P. 457-464.
115. Dang H.-C., Yuan X., Xiao Q., Xiao W.-X., Luo Y.-K., Wang X.-L., Song F., Wang Y.-Z. Facile batch synthesis of porous vaterite microspheres for high efficient and fast removal of toxic heavy metal ions // *J. Environmental Chem. Eng.* 2017. V. 5. P. 4505-4515.
116. Wang J., Chen J.-S., Zong J.-Y., Zhao D., Li F., Zhuo R.-X., Cheng S.-X. Calcium Carbonate/Carboxymethyl Chitosan Hybrid Microspheres and Nanospheres for Drug Delivery // *J. Phys. Chem. C.* 2010. V. 114 (44). P. 18940-18945.
117. Islan G.A., Cacicedo M.L., Bosio V.E., Castro G.R. Development and characterization of new enzymatic modified hybrid CaCO₃ microparticles to obtain nano-architected surfaces for enhanced drug loading // *J. Col. Interface Sci.* 2014. V. 439. P. 76-87.
118. Fu L.-H., Qi Ch., Hua Y.-R., Meib Ch.-G., Ma M.-G. Cellulose/vaterite nanocomposites: Sonochemical synthesis, characterization, and their application in protein adsorption // *Mat. Sc. and Eng.: C* 2019. V. 96. P. 426-435.
119. Lu Z., Zhang J., Ma Y., Song S., Gu W. Biomimetic mineralization of calcium carbonate/carboxymethylcellulose microspheres for lysozyme immobilization // *Mat. Sc. and Eng.: C.* 2012. V. 32. P. 1982-1987.
120. Dou J., Zhao F., Fan W., Chen Z., Guo X. Preparation of non-spherical vaterite CaCO₃ particles by flash nano precipitation technique for targeted and extended drug delivery // *J. Drug Del. Sci. Tech.* 2020. V. 57. P. 101768.
121. Shi P., Luo, S., Voit, B., Appelhans D., Zan X. A Facile and Efficient Strategy to Encapsulate the Model Basic Protein Lysozyme into Porous CaCO₃ // *J. Mater. Chem. B.* 2018. V. 6. P. 4205-4215
122. Shi P., Qin J., Hu J., Bai Y., Zan X. Insight into the mechanism and factors on encapsulating basic model protein, lysozyme, into heparin doped CaCO₃ // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2019. V. 175. P. 184-194.

123. Ramalapa B., Crasson O., Vandevenne M., Gibaud A., Garcion E., Cordonnier Th., Gallenib M., Boury Fr. Protein-polysaccharide complexes for enhanced protein delivery in hyaluronic acid templated calcium carbonate microparticles // *J. Mater. Chem. B*. 2017. V. 5. P. 7360-7368.
124. Lakkakula J.R., Kurapati R., Tynga I., Abrahamse H., Raichur A.M., Krause R.W.M. Cyclodextrin grafted calcium carbonate vaterite particles: efficient system for tailored release of hydrophobic anticancer or hormone drugs // *RSC Adv*. 2016. V. 6. P. 104537-104548
125. Sudareva N.N., Suvorova O.M., Tarasenko I.I., Saprykina, N.N., Smirnova N.V., Petunov S.G., Radilov A.S., Timin A.S., Korzhikova-Vlakh E.G., Vilesov A.D. Hybrid systems for oral delivery of a therapeutic neuropeptide // *Mendeleev Commun*. 2020. V. 30. P. 25-27.
126. Sudareva N.N., Suvorova O.M., Suslov D.N., Galibin O.V., Vilesov A.D. Dextran sulfate coated CaCO₃ vaterites as the systems for regional administration of doxorubicin to rats // *Cellular Therapy and Transplantation* 2021 V. 10 (3-4). P. 71-76.
127. Choukrani G., Freile J.A., Ustyanovska Avtenyuk N., Wan W., Zimmermann K., Bremer E., Dähne L. High Loading Efficiency and Controlled Release of Bioactive Immunotherapeutic Proteins Using Vaterite Nanoparticles // *Part. Part. Syst. Charact*. 2021. V. 38. 2100012.
128. Володькин Д. В. Иммобилизация белков в микрочастицы, сформированные методом последовательной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов: дис. на соискание ученой степени канд. хим. наук: 02.00.15, 03.00.23/ МГУ им. Ломоносова, М., 2005. 166 с.
129. She Z., Antipina M.N., Li J., Sukhorukov G.B. Mechanism of protein release from polyelectrolyte multilayer microcapsules // *Biomacromolecules* 2010. V. 11(5). P. 1241-1247.
130. Vidallon M.L.P., Douek A.M., Quek A., McLiesh H., Kaslin J., Tabor R.F., Bishop A.I., Teo B.M. Gas-Generating, pH-Responsive Calcium Carbonate Hybrid Particles with Biomimetic Coating for Contrast-Enhanced Ultrasound Imaging // *Part. Part. Syst. Charact*. 2020. V. 37 (2). 1900471.
131. Vidallon M.L.P., Yu F., Teo B.M. Controlling the Size and Polymorphism of Calcium Carbonate Hybrid Particles Using Natural Biopolymers // *Cryst. Growth Des*. 2020. V. 20 (2). P. 645-652.
132. Xue J., Li X., Li Q., Lyu J., Wang W., Zhuang L., Xu Y. Magnetic drug-loaded osteoinductive Fe₃O₄/CaCO₃ hybrid microspheres system: efficient for sustained release of antibiotics // *J. Physics D: Applied Physics* 2020. V. 53 (24). P. 245401-245419.
133. Ferreira A.M., Vikulina A.S., Volodkin D. CaCO₃ crystals as versatile carriers for controlled delivery of antimicrobials // *J. Control. Release* 2020. V. 328. P. 470-489.
134. Memar M.Y., Adibkia K., Farajnia S., Kafil H.S., Maleki-Diza S., Ghotaslou R. Biocompatibility, cytotoxicity and antimicrobial effects of gentamicin-loaded CaCO₃ as a drug delivery to osteomyelitis // *J. Drug Del. Sci. Tech*. 2019. V. 54. 101307.

135. Isa T., Zakaria Z.A.B., Rukayadi Y., Hezmee M.N.M., Jaji A.Z., Imam M.U., Hammadi N.I., Mahmood S.K. Antibacterial activity of ciprofloxacin-encapsulated cockle shells calcium carbonate (Aragonite) nanoparticles and its biocompatibility in macrophage J774A.1 // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17 (5). 713.
136. Schröder R., Besch L., Pohlit H., Panthofer M., Roth W., Frey H., Tremel W., Unger R.E. Particles of vaterite, a metastable CaCO₃ polymorph, exhibit high biocompatibility for human osteoblasts and endothelial cells and may serve as a biomaterial for rapid bone regeneration // *J. Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2018. V. 12 (7). P. 1754-1768.
137. Sudareva N.N., Popryadukhin P.V., Saprykina N.N., Suvorova O.M., Yukina G.Yu., Galibin O.V., Vilesov A.D. CaCO₃ vaterites as components of target drug delivery systems // *Cell. Ther. Transplant.* 2020. V. 9(2). P. 13-19.
138. Osada N., Otsuka Ch., Nishikawa Y., Kasuga T. Protein adsorption behaviors on siloxane-containing vaterite particles // *Materials Letters* 2020. V. 264. 127280.
139. Burt H.M., Jackson J.K., Taylor D.R., Crowther R.S. Activation of Human Neutrophils by Calcium Carbonate Polymorphs // *Digestive Diseases and Sciences* 1997. V. 42. P. 1283-1289.
140. Бондарь О.В., Сайфуллина Д.В., Мавлютова И. И., Абдуллин Т. И. Мониторинг дзета-потенциала клеток человека при снижении их жизнеспособности и взаимодействии с полимерами // *Acta naturae* 2012. Т. 4 (1). С. 80-83.
141. Gallin J.I., Fletcher M.P., Seligmann B.E., Hoffstein S., Cehrs K., Mounessa N. Human neutrophil-specific granule deficiency: a model to assess the role of neutrophil-specific granules in the evolution of the inflammatory response // *Blood* 1982. V. 59 (6). P. 1317-1329.
142. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // *Успехи биологической химии* 2009. Т. 49. с. 341-388.
143. Bansil R., Turner B.S. The biology of mucus: Composition, synthesis and organization // *Adv. Drug Del. Rev.* 2017. V. 124(15). P. 3-15.
144. Bansil R., Turner B.S. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications // *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2006. V. 11(2-3). P. 164-170.
145. Linden S.K., Sutton P., Karlsson N.G., Korolik V., McGuckin M.A. Mucins in the mucosal barrier to infection // *Mucosal Immunology* 2008. V. 1. P. 183-197.
146. Roussel P., Delmotte P. The diversity of epithelial secreted mucins // *Current Organic Chemistry* 2004. V. 8 (5). P. 413-437.
147. Dekker J., Rossen J., Buller H., Einerhand A. The MUC family: an obituary // *Trends Biochem. Sci.* 2002. V. 27(3). P. 126-131.
148. Bell S., Xu G., Khatri I., Wang R., Rahman S., Forstner J. N-linked oligosaccharides play a role in disulphide-dependent dimerization of intestinal mucin Muc2 // *Biochem. J.* 2003. V. 373 (3). P. 893-900.

149. Taylor C., Allen A., Dettmar P., Pearson J. The Gel Matrix of Gastric Mucus Is Maintained by a Complex Interplay of Transient and Nontransient Associations // *Biomacromolecules* 2003. V. 4(4). P. 922-927.
150. Lee S., Muller M., Rezwan K., Spencer N. Porcine Gastric Mucin (PGM) at the Water/Poly (Dimethylsiloxane) (PDMS) Interface: Influence of pH and Ionic Strength on Its Conformation, Adsorption, and Aqueous Lubrication Properties // *Langmuir* 2005. V. 21(18). P. 8344-8353.
151. Nikogeorgos N., Madsen J.B., Lee S. Influence of impurities and contact scale on the lubricating properties of bovine submaxillary mucin (BSM) films on a hydrophobic surface // *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2014. V.122. P. 760-766.
152. Cao X., Bansil R., Bhaskar K., Turner B., LaMont J., Niu N. pH-dependent conformational change of gastric mucin leads to sol-gel transition // *Biophys. J.* 1999. V. 76(3). P. 1250-1258.
153. Hong Z., Chasan B., Bansil R., Turner B., Bhaskar K., Afdhal N. Atomic Force Microscopy Reveals Aggregation of Gastric Mucin at Low pH // *Biomacromolecules* 2005. V. 6(6). P. 3458-3466.
154. Rausch P., Rehman A., Kunzel S., Häsler R., Ott S.J., Schreiber S., Rosenstiel P., Franke A., Baines J.F. Colonic mucosa-associated microbiota is influenced by an interaction of Crohn disease and FUT2 (Secretor) genotype // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011. V.108. P. 19030-19035.
155. Wacklin P., Tuimala J., Nikkila J., Tims S., Mäkivuokko H., Alakulppi N., Laine P., Rajilic-Stojanovic M., Paulin L., de Vos W.M., Mättö J. Faecal microbiota composition in adults is associated with the FUT2 gene determining the secret status // *Plos one* 2014. V. 9(4). e94863.
156. Pacheco A. R., Curtis M. M., Ritchie J. M., et al. Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization// *Nature* 2012. V. 492. P. 113-119.
157. Kashyap P. C., Marcobal A., Ursell L. K., Knight R., Gordon J.I., Sonnenburg J.L. Genetically dictated change in host mucus carbohydrate landscape exerts a diet-dependent effect on the gut microbiota// *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013. V. 110(42). P. 17059-17064.
158. Sommer F., Adam N., Johansson M.E., Xia L., Hansson G.C., Bäckhed F. Altered mucus glycosylation in core 1 O-glycan-deficient mice affects microbiota composition and intestinal architecture // *Plos one* 2014. V. 9(1). e85254.
159. Louise E.T., Owen C. D., Walshaw J., Tailford L.E., Owen C.D., Walshaw J., Crost E.H., Hardy-Goddard J., Le Gall G., de Vos W.M., Taylor G.L., Juge N. Discovery of intramolecular trans-sialidases in human gut microbiota suggests novel mechanisms of mucosal adaptation // *Nathalie Juge* 2015. V. 6. P. 7624.
160. Parmar A.S., Alakulppi N., Paavola-Sakki P., Kurppa K., Halme L., Färkkilä M., Turunen U., Lappalainen M., Kontula K., Kaukinen K., Mäki M., Lindfors K., Partanen J., Sistonen P., Mättö J., Wacklin P., Saavalainen P., Einarsdottir E. Association study of FUT2 (rs601338) with celiac disease and inflammatory bowel disease in the Finnish population // *Tissue Antigens* 2012. V. 80. P. 488-493.

161. Corfield A.P. The roles of enteric bacterial sialidase, sialate O-acetyl esterase and glycosulfatase in the degradation of human colonic mucin // *Glycoconj J.* 1993. V.10. P. 72-81.
162. McGovern D.P., Jones M.R., Taylor K. D., Marciante K., Yan X., Dubinsky M., Ippoliti A., Vasiliauskas E., Berel D., Derkowski C., Dutridge D., Fleshner P., Shih D.Q., Melmed G., Mengesha E., King L., Pressman S., Haritunians T., Guo X., Targan S.R., Rotter J.I. International IBD Genetics Consortium. Fucosyltransferase 2 (FUT2) non-secretor status is associated with Crohn's disease // *Hum. Mol. Genet.* 2010. V. 19. P. 3458-3476.
163. Buisine M.P., Desreumaux P., Debailleul V., Gambiez L., Geboes K., Ectors N., Delescaut M.P., Degand P., Aubert J.P., Colombel J.F., Porchet N. Abnormalities in mucin gene expression in Crohn's disease // *Inflamm Bowel Dis.* 1999. V. 5. P. 24-32.
164. Larsson J. M., Karlsson H., Crespo J. G., Johansson M.E., Eklund L., Sjövall H., Hansson G.C. Altered O-glycosylation profile of MUC2 mucin occurs in active ulcerative colitis and is associated with increased inflammation // *Inflamm. Bowel Dis.* 2011. V. 17. P. 2299-2307.
165. Rausch P., Rehman A., Kunzel S., Häsler R., Ott S.J., Schreiber S., Rosenstiel P., Franke A., Baines J.F. Colonic mucosa-associated microbiota is influenced by an interaction of Crohn disease and FUT2 (Secretor) genotype // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011. V. 108. P. 19030-19035.
166. Burchell J.M., Beatson R., Graham R., Taylor-Papadimitriou J., Tajadura-Ortega V. O-linked mucin-type glycosylation in breast cancer // *Biochem. Soc. Trans.* 2018. V. 46(4). P. 779-788.
167. Manichanh C., Borrueil N., Casellas F., Guarner F. The gut microbiota in IBD // *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 2012. V. 9. P. 599-608.
168. Moran A.P., Gupta A., Joshi L. Sweet-talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract // *Gut* 2011. V. 60. P. 1412-1425.
169. McGuckin M.A., Lindén S.K., Sutton P., Florin T.H. Mucin dynamics and enteric pathogens // *Nat. Rev. Microbiol.* 2011. V. 9. P. 265-278.
170. Berg A.A., Buul J.D., Tytgat G. N. J., Groen A. K. J., Ostrow D. Mucins and calcium phosphate precipitates additively stimulate cholesterol crystallization // *J. Lipid Res.* 1998. V. 39. P. 1744-1751.
171. Raynal B.D., Hardingham T.E., Sheehan, J.K., Thornton D.J. Calcium-dependent protein interactions in MUC5B provide reversible cross-links in salivary mucus // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 28703-28710.
172. Su Y., Xu Y., Yang L., Wenga S., Soloway R.D., Wang D., Wua J. Spectroscopic studies of the effect of the metal ions on the structure of mucin // *Journal of Molecular Structure* 2009. V. 920. P. 8-13.
173. Ambort D., Johansson M.E., Gustafsson J.K., Nilsson H.E., Ermund A., Johansson B.R., Koeck P.J.B., Hebert H., Hansson G.C. Calcium and pH-dependent packing and release of the gel-forming MUC2 mucin // *PNAS* 2012. V. 109(15). P. 5645-5650.

174. Yamasaki T., Chijiwa K., Endo M. Isolation of mucin from human hepatic bile and its induced effects on precipitation of cholesterol and calcium carbonate in vivo // *Digestive Diseases and Sciences* 1993. V. 38(5). P. 909-915.
175. Marczynski M., Kimna C., Lieleg O. Purified mucins in drug delivery research // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2021. V. 178. 113845.
176. Schömig V.J., Käs Dorf B.T., Scholz C.S., Bidmon K., Lieleg O., Berensmeier S. An optimized purification process for porcine gastric mucin with preservation of its native functional properties // *The Royal Society of Chemistry* 2016. V. 6. P. 44932-44943.
177. Petrou G., Crouzier T. Mucins as multifunctional building blocks of biomaterials // *Biomater. Sci.* 2018. V. 6(9). P. 2282-2297.
178. Co J.Y., Crouzier T., Ribbeck K. Probing the role of mucin-bound glycans in bacterial repulsion by mucin coatings // *Adv. Mater. Interfaces* 2015. V. 2. P. 1500179.
179. Winkeljann B., Bauer M.G., Marczynski M., Rauh T., Sieber S.A., Lieleg O. Covalent mucin coatings form stable anti-biofouling layers on a broad range of medical polymer materials // *Adv. Mater. Interfaces* 2020. V. 7(4). 1902069.
180. Winkeljann B., Leipold P.-M.A., Lieleg O. Macromolecular coatings enhance the tribological performance of polymer-based lubricants // *Adv. Mater. Interfaces* 2019. V. 6 1900366.
181. Rickert C.A., Wittmann B., Fromme R., Lieleg O. Highly Transparent Covalent Mucin Coatings Improve the Wettability and Tribology of Hydrophobic Contact Lenses // *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2020. V. 12(25). P. 28024-28033.
182. Kimna C., Winkeljann B., Song J., Lieleg O. Smart biopolymer-based multilayers enable consecutive drug release events on demand // *Adv. Mater. Interfaces* 2020. V. 7. 2000735.
183. Svensson O., Arnebrant T. Mucin layers and multilayers - Physicochemical properties and applications // *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2010. V. 15. P. 395-405.
184. Shi L., Caldwell K.D. Mucin Adsorption to Hydrophobic Surfaces // *J. Colloid Interface Sci.* 2000. V. 224(2). P. 372-381.
185. Svensson O., Lindh L., Cardenas M., Arnebrant T. Layer-by-layer assembly of mucin and chitosan - influence of surface properties, concentration and type of mucin // *J. Colloid Interface Sci.* 2006. V. 299. P. 608-616.
186. Ahn J., Crouzier T., Ribbeck K., Rubher M.F., Cohen R.E. Turning the properties of mucin via layer-by-layer assembly // *Biomacromolecules* 2015. V. 16(1). P. 228-235.
187. Lindh L., Svendsen I.E., Svensson O. Cárdenas M., Arnebrant T. The salivary mucin MUC5B and lactoperoxidase can be used for layer-by-layer film formation // *J. Colloid Interface Sci.* 2007. V. 310. P. 74-82.

188. Nikogeorgo N., Patil N.J., Zappone B., Lee S. Interaction of porcine gastric mucin with various polycations and its influence on the boundary lubrication properties // *Polymer* 2016. V. 100. P. 158-168.
189. Nowald C., Penk, A., Chiu H-Y., Bein T., Huster D., Lieleg O. A Selective mucin/Methylcellulose Hybrid Gel with Tailored Mechanical Properties // *Macromol. Biosci.* 2016. V. 16. P. 567-579.
190. Audu M., Umale A.M., Chinnedu I.E. Formulation and evaluation the bioadhesive properties of drug delivery system based on PEGylated mucin matrices // *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2010. V. 3. P. 461-464.
191. Eraga S.O., Arhewoh M.I., Iwuagwu M.A., Ukponahiusi O.E. Formulation and in vitro release studies of PEGylated mucin-based matrix tablets // *Pak. J. Pharm. Sci.* 2015. V. 28. P. 113-118.
192. Ofokansi K.C., Okorie O., Adikwu M.U. Biodegradable microspheres based on gelatin/porcine mucin admixtures: In vitro and in vivo delivery studies // *Biol. Pharm. Bull.* 2009. V. 32. P.1754-1759.
193. Builders P.F., Kunle O.O., Okpaku L.C., Builders M.I., Attama A.A., Adikwu M.U. Preparation and evaluation of mucinated sodium alginate microparticles for oral delivery of insulin // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008. V. 70. P. 777-783.
194. Laurén P., Paukkonen H., Lipiäinen T., Dong Y., Oksanen T., Rääkkönen H., Ehlers H., Laaksonen P., Yliperttula M., Laaksonen T. Pectin and mucin enhance the bioadhesion of drug loaded nanofibrillated cellulose films // *Pharm. Res.* 2018. V. 35(7). P. 145.
195. Mumuni M.A., Kenchukwu F.C., Ofokansi K.C., Attama A.A., Díaz D.D. Insulin-loaded mucoadhesive nanoparticles based on mucin-chitosan complexes for oral delivery and diabetes treatment // *Carbohydr. Polym.* 2020. V. 229. P. 115506
196. Kimna C., Lieleg O. Engineering an orchestrated release avalanche from hydrogels using DNA-nanotechnology // *J. Control. Release* 2019. V. 304. P. 19-28.
197. Yan H., Chircov C., Zhong X., Winkeljann B., Dobryden I., Nilsson H.E., Lieleg O. Claesson P.M., Hedberg Y., Crouzier T. Reversible condensation of mucins into nanoparticles // *Langmuir* 2018. V. 34. P. 13615-13625.
198. Fukui Y., Fukuda M., Fujimoto K. Generation of mucin gel particles with selfdegradable and -releasable properties // *J. Mater. Chem. B* 2018. V. 6. P. 781-788.
199. Crouzier T., Beckwitt C.H., Ribbeck K, Mucin multilayers assembled through sugar–lectin interactions // *Biomacromolecules* 2012. V. 13. P. 3401-3408.
200. Polak R., Crouzier T., Lim R.M., Ribbeck K., Beppu M.M., Pitombo R.N.M., Cohen R.E., Rubner M.F. Sugar-mediated disassembly of mucin/lectin multilayers and their use as pH-tolerant, on-demand sacrificial layers // *Biomacromolecules* 2014. V. 15. P. 3093-3098.
201. Kimna C., Lutz T.M., Yan H., Song J., Crouzier T., Lieleg O. DNA strands trigger the intracellular release of drugs from mucin-based nanocarriers // *ACS Nano* 2020. V. 15(2). P. 2350-2362.

202. Makhlof A., Werle M., Takeuchi H. Mucoadhesive drug carriers and polymers for effective drug delivery // *J. Drug Del. Sci. Tech.* 2008. V. 18 (6). P. 375-386.
203. Shivanand P. Non-invasive insulin delivery systems: challenges and needs for improvement // *Int. J. Pharm. Tech. Res.* 2010. V. 2(1). P. 603-614.
204. Şenel S. Potential applications of chitosan in oral mucosal delivery // *J. Drug Del. Sci. Tech.* 2010. V. 20(1). P. 23-32.
205. Pather S.I., Rathbone M.J., Senel S. Current status and the future of buccal drug delivery systems // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2008. V. 5(5). P. 531-542.
206. Consuelo I.D., Jacques Y., Pizzolato G., Guy R.H., Falson F. Comparison of the lipid composition of porcine buccal and esophageal permeability barriers // *Arch. Oral Biol.* 2005. V. 50 (12). P. 981-987.
207. Soane R.J., Frier M., Perkins A.C., Jones N.S., Davis S.S., Illum L. Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans // *Int. J. Pharm.* 1999. V. 178(1). P. 55-65.
208. Hinchcliffe M., Illum L. Intranasal insulin delivery and therapy // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1999. V. 35(2-3). P. 199-234.
209. Patel V.F., Liu F., Brown M.B. Advances in oral transmucosal drug delivery // *J. Control. Release* 2011. V. 153(2). P. 106-116.
210. Peppas N.A., Kavimandan N.J. Nanoscale analysis of protein and peptide absorption: insulin absorption using complexation and pH-sensitive hydrogels as delivery vehicles // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2006. V. 29(3-4). P. 183-197.
211. Hamman J.H., Enslin G.M., Kotze A.F. Oral delivery of peptide drugs: barriers and developments // *BioDrugs* 2005. V. 1(3). P. 165-177.
212. Ludwig A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005. V. 579 (11). P. 1595-1639.
213. Fefelova N., Nurkeeva Z., Mun G., Khutoryanskiy V. Mucoadhesive interactions of amphiphilic cationic copolymers based on [2-(methacryloyloxy) ethyl] trimethyl ammonium chloride // *Int. J. Pharm.* 2007. V. 339 (1-2). P. 25-32.
214. He P., Davis S., Illum L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres // *Int. J. Pharm.* 1998. V. 166 (1). P. 75-88.
215. Needleman I.G., Smales F.C. In vitro assessment of bioadhesion for periodontal and buccal drug delivery // *Biomaterials* 1995. V. 16(8). P. 617-624.
216. Takayama K., Hirata M., Machida Y., Masada T., Sannan T., Nagai T. Effect of interpolymer complex formation on bioadhesive property and drug release phenomenon of compressed tablet consisting of chitosan and sodium hyaluronate // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 1990. V. 38 (7). P. 1993-1997.

217. Thirawong N., Nunthanid J., Puttipipatkachorn S., Sriamornsak P. Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: an in vitro evaluation using texture analyzer // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2007. V. 67 (1). P. 132-140.
218. Gu J.M., Robinson J.R., Leung S.H. Binding of acrylic polymers to mucin/epithelial surfaces: structure-property relationships // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1988. V. 5 (1). P. 21-67.
219. Takishima J., Onishi H., Machida Y. Prolonged intestinal absorption of cephadrine with chitosan-coated ethylcellulose microparticles in rats // *Biol. Pharm. Bull.* 2002. V. 25 (11). P. 1498-1502.
220. Langguth P., Bohner V., Heizman J., Merkle H.P., Wolfram S., Amidon G.L., Yamashita S. The challenge of proteolytic enzymes in intestinal peptide delivery // *Int. J. Pharm.* 1997. V. 46 (1). P. 39-57.
221. Woodley J.F. Enzymatic barriers for GI peptide and protein delivery // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1994. V. 11 (2-3). P. 61-65.
222. Werle M., Takeuchi H. Strategies to overcome the enzymatic barrier // *Oral delivery of macromolecular drugs: barriers, strategies and future trends* [ed. Bernkop-Schnürch A.]. New York: Springer Science + Business Media. 2009. P. 65-83.
223. Schilling R.J., Mitra A.K. Intestinal mucosal transport of insulin // *Int. J. Pharm.* 1990. V. 62 (1). P. 53-54.
224. Rubinstein A., Tirosh B., Baluom M., Nassar T., David A., Radai R., Gliko-Kabir I., Friedman M. The rationale for peptide drug delivery to the colon and the potential of polymeric carriers as effective tools // *J. Control. Release* 1997. V. 46 (1-2). P. 59-73.
225. Besheer A., Wood K.M., Peppas N.A., Mäder K. Loading and mobility of spin-labeled insulin in physiologically responsive complexation hydrogels intended for oral administration // *J. Control. Release* 2006. V. 111 (1-2). P. 73-80.
226. Takeuchi H., Yamamoto H., Niwa T., Hino T., Kawashima Y. Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes // *Pharm. Res.* 1996. V. 13 (6). P. 896-901.
227. Mathiowitz E., Jacob J.S., Jong Y.S., Carino G.P., Chickering D.E., Chaturvedi P., Santos C.A., Vijayaraghavan K., Montgomery S., Bassett M., Morrell C. Biologically erodable microspheres as potential oral drug delivery systems // *Nature* 1997. V. 386 (6623). P. 410-414.
228. Thompson C.J, Tetley L., Cheng W.P. The influence of polymer architecture on the protective effect of novel comb shaped amphiphilic poly(allylamine) against in vitro enzymatic degradation of insulin towards oral insulin delivery // *Int. J. Pharm.* 2010. V. 383 (1-2). P. 216-227.
229. Ameye D., Voorspoels J., Foreman P., Tsai J., Richardson P., Geresh S., Remon J.P. Trypsin inhibition, calcium and zinc ion binding of starch-g-poly (acrylic acid) copolymers and starch/poly (acrylic acid) mixtures for peroral peptide drug delivery // *J. Control. Release* 2001. V. 7 (3). P. 357-364.

230. Sateesh S., Vauthier C., Gueutin C., Ponchel G., Sharma C.P. Thiol functionalized polymethacrylic acid-based hydrogel microparticles for oral insulin delivery // *Acta Biomater.* 2010. V. 6(8). P. 3072-3080.
231. Reis C.P., Veiga F.J., Ribeiro A.J., Neufeld R.J., Damgé C. Nanoparticulate biopolymers deliver insulin orally eliciting pharmacological response // *J. Pharm. Sci.* 2008. V. 97 (12). P. 5290-5305.
232. Woitiski C.B., Neufeld R.J., Veiga F., Carvalho R.A., Figueiredo I.V. Pharmacological effect of orally delivered insulin facilitated by multilayered stable nanoparticles // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2010. V. 4(3-4). P. 556-563.
233. Lueßen H.L., Bohner V., Pérard D., Langguth P., Verhoef J.C., de Boer A.G., Merkle H.P., Junginger H.E. Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery. V. Effect of poly(acrylates) on the enzymatic degradation of peptide drugs by intestinal brush border membrane vesicles // *Int. J. Pharm.* 1996. V. 141(1-2). P. 39-52.
234. Wu Z.H., Ping Q.N., Song Y.M., Lei X.M., Li J.Y., Cai P. Studies on the insulin-liposomes double-coated by chitosan and chitosan-EDTA conjugates // *Acta Pharmaceutica* 2004. V. 39(11). P. 933-938.
235. Loretz B., Föger F., Werle M., Bernkop-Schnürch A. Oral gene delivery: Strategies to improve stability of pDNA towards intestinal digestion // *J. Drug Targ.* 2006. V. 14(5). P. 311-319.
236. Biruss B., Valenta C. Skin permeation of different steroid hormones from polymeric coated liposomal formulations // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2006. V. 62(2). P. 210-219.
237. Madsen F., Peppas N.A. Complexation graft copolymer networks: swelling properties, calcium binding and proteolytic enzyme inhibition // *Biomaterials* 1999. V. 20(18). P. 1701-708.
238. Fujii S., Yokoyama T., Ikegaya K., Sato F., Yokoo N. Promoting effect of the new chymotrypsin inhibitor FK-448 on the intestinal absorption of insulin in rats and dogs // *J. Pharm. Pharmacol.* 1985. V. 37(8). P. 545-549.
239. Yamamoto A., Taniguchi T., Rikyuu K., Tsuji T., Fujita T., Murakami M., Muranishi S. Effects of various protease inhibitors on the intestinal absorption and degradation of insulin in rats // *Pharm. Res.* 1994. V. 11(10). P. 1496-1500.
240. Werle M., Loretz B., Entstrasser D., Föger F. Design and evaluation of a chitosan-aprotinin conjugate for the peroral delivery of therapeutic peptides and proteins susceptible to enzymatic degradation // *J. Drug Targ.* 2007. V. 15(5). P. 327-333.
241. Watanabe S., Takeuchi T., Chey W.Y. Mediation of trypsin inhibitor-induced pancreatic hypersecretion by secretin and cholecystokinin in rats // *Gastroenterology* 1992. V. 102(2). P. 621-628.
242. Bernkop-Schnürch A., Gockel N.C. Development and analysis of a polymer protecting from luminal enzymatic degradation caused by α -chymotrypsin // *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1997. V. 23(8). P. 733-740.

243. Березин И.В., Казанская Н.Ф., Ларионова Н.И. Взаимодействие четырех активных форм трипсина со специфическим субстратом и панкреатическим ингибитором // Биохимия 1970. V. 35(5). P. 983-988.
244. Ascenzi P., Vocedi A., Bolognesi M., Spallarossa A., Coletta M., De Cristofaro R., Menegatti E. The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor): a milestone protein // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2003. V. 4 (3). P. 231-251.
245. Plate N.A., Valuev I.L., Sytov G.A., Valuev L.I. Mucoadhesive polymers with immobilized proteinase inhibitors for oral administration of protein drugs // *Biomaterials* 2002. V. 23(7). P. 1673-1677.
246. Ларионова Н.И., Гладышева И.П., Тихонова Т.В., Казанская Н.Ф. Ингибирование катепсина G и эластазы гранулоцитов человека множественными формами соевого ингибитора типа Баумана-Бирк // Биохимия 1993. V. 58(9). С. 1437-1444.
247. Sampaio C.A., Oliva M.L., Sampaio M.U., Batista I.F., Bueno N.R., Tanaka A.S., Auerswald E.A., Fritz H. Plant serine proteinase inhibitors. Structure and biochemical applications on plasma kallikrein and related enzymes // *Immunopharmacology* 1996. V. 32(1-3). P. 62-66.
248. Bösterling B., Quast U. Soybean trypsin inhibitor (Kunitz) is doubleheaded. Kinetics of the interaction of alpha-chymotrypsin with each side // *Biochim. Biophys. Acta.* 1981. V. 657(1). P. 58-72.
249. Matsushima A., Ashida Y., Watanabe J., Hirata T. Characterization of recombinant p20 trypsin inhibitor, a new protein from *Glycine max* // *Plant Biotechnol.* 2003. V. 20(1). P. 93-96.
250. Larionova N.V., Ponchel G., Duchêne D., Larionova N.I. Biodegradable cross-linked starch/protein microcapsules containing proteinase inhibitor for oral protein administration // *Int. J. Pharm.* 1999. V. 189(2). P. 171-178.
251. Kimura T., Sato K., Sugimoto K., Tao R., Murakami T., Kurosaki Y., Nakayama T. Oral administration of insulin as poly (vinyl alcohol)-gel spheres in diabetic rats // *Biol. Pharm. Bull.* 1996. V. 19(6). P. 897-900.
252. Валуев И.Л., Сытов Г.А., Валуев Л.И., Валуева Т.А., Ульянова М.В., Плате Н.А. Ингибиторы протеолитических ферментов в терапии сахарного диабета // *Вопр. мед. химии* 2001. Т. 47(1). С. 132-139.
253. Krauland A.H., Guggi D., Bernkop-Schnürch A. Oral insulin delivery: the potential of thiolated chitosan-insulin tablets on non-diabetic rats // *J. Control. Release* 2004. V. 95(3). P. 547-555.
254. Marschütz M.K., Bernkop-Schnürch A. Oral peptide drug delivery: polymer-inhibitor conjugates protecting insulin from enzymatic degradation in vitro // *Biomaterials* 2000. V. 21(14). P. 1499-1507.
255. Nagai T., Morishita M., Maitani Y. Trials of enteral delivery of peptide drugs // *Recent Adv. in Peptide and Protein Delivery*, 8 Int. Pharm. Tech. Symp. Ankara. 1996. P. 45-57.
256. Chen M.C., Sonaje K., Chen K.J., Sung H.W. A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery // *Biomaterials* 2011. V. 32(36). P. 9826-9838.

257. Ponchel G., Irache J. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998. V. 34(2-3). P. 191-219.
258. O'Hagan D.T. The intestinal uptake of particles and the implications for drug and antigen delivery // *J. Anat.* 1996. V. 189(3). P. 477-482.
259. Damgé C., Reis C.P., Ubrich N., Maincent P., Veiga F., Ribeiro A. Nanoparticules d'insuline à base d'alginate-dextran pour l'administration orale chez le rat diabétique // *Diabet. Metabol.* 2007. V. 33(1). P. 67-89.
260. van der Lubben I.M., van Opdorp F.A., Hengeveld M.R., Onderwater J.J., Koerten H.K., Verhoef J.C., Borchard G., Junginger H.E. Transport of chitosan microparticles for mucosal vaccine delivery in a human intestinal M-cell model // *J. Drug Targ.* 2002. V. 10(6). P. 449-456.
261. Desai M.P., Labhassetwar V., Amidon G.L., Levy R.J. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size // *Pharm. Res.* 1996. V. 13(12). P. 1838-1845.
262. Billings P.C., Brandon D.L., Habres J.M. Internalisation of the Bowman-Birk protease inhibitor by intestinal epithelial cells // *Eur. J. Cancer.* 1991. V. 7(27). P. 903-908.
263. Chiba H., Osanai M., Murata M., Kojima M., Sawada N. Transmembrane proteins of tight junctions // *Biochim. Biophys. Acta* 2008. V. 1778(3). P. 588-600.
264. Smith J.M., Dornish M., Wood E.J. Involvement of protein kinase C in chitosan glutamate-mediated tight junction disruption // *Biomaterials* 2005. V. 26(16). P. 3269-3276.
265. Sonaje K., Lin Y.H., Juang J.H., Wey S.P., Chen C.T., Sung H.W. In vivo evaluation of safety and efficacy of self-assembled nanoparticles for oral insulin delivery // *Biomaterials* 2009. V. 30(12). P. 2329-2339.
266. Kriwet B., Kissel T. Poly (acrylic acid) microparticles widen the intercellular spaces of Caco-2 cell monolayers: An examination by confocal laser scanning microscopy // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1996. V. 429(4). P. 233-240.
267. Kassab F.J., Marques R.P., Lacaz-Vieira F. Modeling tight junction dynamics and oscillations // *J. Gen. Physiol.* 2002. V. 120(2). P. 237-247.
268. Bravo-Osuna I., Millotti G., Vauthier C., Ponchel G. In vitro evaluation of calcium binding capacity of chitosan and thiolated chitosan poly (isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles // *Int. J. Pharm.* 2007. V. 338(1-2). P. 284-290.
269. Lima I.S., Airoidi C. A thermodynamic investigation on chitosan-divalent cation interactions // *Thermochimica Acta* 2004. V. 421(1-2). P. 133-139.
270. Artursson P., Lindmark T., Davis S.S., Illum L. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2) // *Pharm. Res.* 1994. V. 11(9). P. 1358-1361.
271. Caramella C., Ferrari F., Bonferoni M.C., Rossi S., Sandri G. Chitosan and its derivatives as drug penetration enhancers // *J. Drug Del. Sci. Tech.* 2010. V. 20(1). P. 5-13.

272. Shukla A., Almeida B. Advances in cellular and tissue engineering using layer-by-layer assembly // Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. 2014. V. 6. P. 411-421.
273. Liu T., Wang Y., Zhong W., Li B., Mequanint K., Luo G., Xing M. Biomedical applications of layer-by-layer selfassembly for cell encapsulation: current status and future perspectives // Adv. Healthc. Mater. 2019. V. 8 (1). e1800939.
274. Fukuda Y., Akagi T., Asaoka T., Eguchi H., Sasaki K., Iwagami Y., Yamada D., Noda T., Kawamoto K., Gotoh K, Kobayashi S., Mori M., Doki Y., Akashi M. Layer-by-layer cell coating technique using extracellular matrix facilitates rapid fabrication and function of pancreatic β -cell spheroids // Biomaterials 2018. V. 160. P. 82-91.
275. Cai X., Gao X., Wang L., Wu Q., Lin X. 2013. A layer-by-layer assembled and carbon nanotubes/gold nanoparticles-based bienzyme biosensor for cholesterol detection // Sens. Actuators B. 2013. V. 181. P. 575-583.
276. Barsan M.M., David M., Florescu M., Tugulea L., Brett C.M. A new self-assembled layer-by-layer glucose biosensor based on chitosan biopolymer entrapped enzyme with nitrogen doped graphene // Bioelectrochemistry 2014. V. 99. P. 46-52.
277. Séon L., Lavalley P., Schaaf P., Boulmedais F. Polyelectrolyte multilayers: a versatile tool for preparing antimicrobial coatings // Langmuir 2015. V. 31. P. 12856-12872.
278. Tang T., Weng T., Jia H., Luo S., Xu Y., Li L., Zhang P. Harnessing the layer-by-layer assembly technique to design biomaterials vaccines for immune modulation in translational applications // Biomater. Sci. 2019. V. 7. P. 715-732.
279. Costa R.R., Alatorre-Meda M, Mano J.F. Drug nano-reservoirs synthesized using layer-by-layer technologies // Biotechnol. Adv. 2015. V. 33. P. 1310-1326.
280. 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// Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2010. V.49(39). P. 6954-6973.
281. De Koker S., Naessens T., De Geest B.G., Bogaert P., Demeester J., De Smedt S., Grooten J. Biodegradable polyelectrolyte microcapsules: antigen delivery tools with Th17 skewing activity after pulmonary delivery // J. Immunol. 2010. V. 184(1). P. 203-211.
282. De Koker S., Lambrecht B.N., Willart M.A., van Kooyk Y., Grooten J., Vervaet C., Remon J.P., De Geest B.G. Designing polymeric particles for antigen delivery // Chem. Soc. Rev. 2011. V. 40(1). P. 320-339.
283. De Geest B.G., Dejugnat C., Prevot M., Sukhorukov G.B., Demeester J., De Smedt S.C. Self-Rupturing and Hollow Microcapsules Prepared from Bio-polyelectrolyte-Coated Microgels // Adv. Funct. Mater. 2007. V. 17(4). P. 531-537.

284. Zhang Y., Xiong G.M., Ali Y., Boehm B.O., Huang Y.Y., Venkatraman S. Layer-by-layer coated nanoliposomes for oral delivery of insulin // *Nanoscale* 2021. V.13(2). P. 776-789.
285. Itoh Y., Matsusaki M., Kida T., Akashi M. Enzyme-responsive release of encapsulated proteins from biodegradable hollow capsules // *Biomacromolecules* 2006. V. 7(10). P. 2715-2718.
286. Itoh Y., Matsusaki M., Kida T., Akashi M. Time-modulated Release of Multiple Proteins from Enzyme-responsive Multilayered Capsules // *Chem. Lett.* 2008. V. 37(3). P. 238-239.
287. Rivera-Gil P., De Koker S., De Geest B.G., Parak W.J. Intracellular processing of proteins mediated by biodegradable polyelectrolyte capsules. // *Nano Lett.* 2009. V. 9(12). P. 4398-4402.
288. 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. V. 8(2). P. 3705-3711.
289. Mansoor S., Kondiah P.P.D, Choonara Y.E., Pillay V. Polymer-Based Nanoparticle Strategies for Insulin Delivery // *Polymers (Basel)* 2019. V. 1(9). P.1380.
290. Yoshida K., Hasebe Y., Takahashi S., Sato K., Anzai J. Layer-by-layer deposited nano- and micro-assemblies for insulin delivery: a review // *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2014. V. 34. P. 384-392.
291. 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 // *Adv. Mater.* 2006. V. 18(8). P. 1005-1009.
292. Borodina T., Markvicheva E., Kunizhev S., Möhwald H., G.B. Sukhorukov G., Kreft O. Controlled release of DNA from self-degrading microcapsules // *Macromol. Rapid Comm.* 2007. V. 28 (18-19). P. 1894-1899.
293. Alkekhia D., Hammond P.T., Shukla A. Layer-by-Layer Biomaterials for Drug Delivery // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2020. V. 22. P. 1-24.
294. Zhang X., Liang T., Ma Q. Layer-by-Layer assembled nano-drug delivery systems for cancer treatment // *Drug. Deliv.* 2021. V. 28(1). P. 655-669.
295. Poojari R., Kini S, Srivastava R., Panda D. Intracellular interactions of electrostatically mediated layer-by-layer assembled polyelectrolytes based sorafenib nanoparticles in oral cancer cells // *Colloids Surf B Biointerfaces* 2016. V.143. P. 131-138.
296. Trushina D.B., Borodina T.N., Belyakov S., Antipina M.N. Calcium carbonate vaterite particles for drug delivery: Advances and challenges // *Materials Today Advances* 2022. V. 4. 100214.
297. Jain R.K., Stylianopoulos T. 2010. Delivering nanomedicine to solid tumors // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2010. V. 7. P.653-664.
298. Such G.K., Yan Y., Johnston A.P.R., Gunawan S.T., Caruso F. 2015. Interfacing materials science and biology for drug carrier design // *Adv. Mater.* 2015. V. 27. P. 2278-2297.

299. Li J., Qu X., Payne G.F., Zhang C., Zhang Y., Li J., Ren J., Hong H., Liu C. Biospecific self-assembly of a nanoparticle coating for targeted and stimuli-responsive drug delivery // *Adv. Funct. Mater.* 2015. V. 25. P. 1404-1417.
300. Li Q.L., Sun Y., Sun Y.L., Wen J., Zhou Y., Bing Q.M, Isaacs L.D., Jin Y., Gao H., Yang Y.W. Mesoporous Silica Nanoparticles Coated by Layer-by-Layer Self-assembly Using Cucurbit [7] uril for in Vitro and in Vivo Anticancer Drug Release // *Chem. Mater.* 2014. V. 26(22). P. 6418-6431.
301. Marquez M., Nilsson S., Lennartsson L., Liu Z., Tammela T., Raitanen M., Holmberg A.R. Charge-Dependent Targeting: Results in Six Tumor Cell Lines // *Anticancer Res.* 2004. V. 24. P. 1347-1352.
302. Ang I.L., Poon T.C.W., Lai P.B.S., Chan A.T.C., Ngai S., Hui A.Y., Johnson P.J., Sung J.J.Y. Study of Serum Haptoglobin and Its Glycoforms in the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma; A Glycoproteomic Approach // *J. Proteome Res.* 2006. V. 5. P. 2691-2700.
303. Akasov R., Borodina T., Zaytseva E., Sumina A., Bukreeva T., Burov S., Markvicheva E. Ultrasonically Assisted Polysaccharide Microcontainers for Delivery of Lipophilic Antitumor Drugs: Preparation and in Vitro Evaluation // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2015. V. 7(30). P. 16581-16589.
304. Hirsjarvi S., Passirani C., Benoit J.-P. Passive and active tumour targeting with nanocarriers // *Curr. Drug. Discov. Technol.* 2011. V. 8. P. 188-196.
305. Szczepanowicz K., Bzowska M., Kruk T., Karabasz A., Bereta J., Warszynski P. Pegylated polyelectrolyte nanoparticles containing paclitaxel as a promising candidate for drug carriers for passive targeting // *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2016. V. 143. P. 463-471.
306. Priya P., Raj R.M., Vasanthakumar V., Raj V. Curcumin-loaded layer-by-layer folic acid and casein coated carboxymethyl cellulose/casein nanogels for treatment of skin cancer // *Arabian J. Chem.* 2020. V. 13. P. 694-708.
307. Zhou J., Pishko M.V., Lutkenhaus J.L. Thermoresponsive layer-by-layer assemblies for nanoparticle-based drug delivery // *Langmuir* 2014. V. 30. P. 5903-5910.
308. Zhou J., Romero G., Rojas E., S. Moya S., Ma L., Gao C. Folic Acid Modified Poly (lactide-co-glycolide) Nanoparticles, Layer-by-Layer Surface Engineered for Targeted Delivery // *Macromol. Chem. Phys.* 2010. V. 211. P. 404-411.
309. Zhou J., Romero G., Rojas E., Ma L., Moya S., Gao C. Layer by layer chitosan/alginate coatings on poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for antifouling protection and Folic acid binding to achieve selective cell targeting // *J. Colloid. Interface* 2010. V. 345(2). P. 241-247.
310. Dreaden E.C., Morton S.W., Shopsowitz K.E., Choi J.H., Deng Z.J., Cho N.J., Hammond P.T. Bimodal tumor-targeting from microenvironment responsive hyaluronan layer-by-layer (LbL) nanoparticles // *ACS Nano* 2014. V. 8. P. 8374-8382.

311. Li F., Zhao X., Wang H., Zhao R., Ji T., Ren H., Anderson G.J., Nie G., Hao J. Multiple layer-by-layer lipid-polymer hybrid nanoparticles for improved FOLFIRINOX chemotherapy in pancreatic tumor models // *Adv. Funct. Mater.* 2015. V. 25. P. 788-779.
312. Xie L., Tong W., Yu D., Xu J., Li J., Gao C. Bovine serum albumin nanoparticles modified with multilayers and aptamers for pH-responsive and targeted anti-cancer drug delivery // *J. Mater. Chem.* 2012. V. 22. P. 6053-6060.
313. Гладилин А.К. Принципы конструирования биокаталитических систем на основе полиэлектролитов в среде органических растворителей. Диссертация докт. хим. наук, М.: МГУ, 1999, 293 с.
314. Delvart A., Moreau C., Cathala B. Dextrans and dextran derivatives as polyelectrolytes in layer-by-layer processing materials - A review // *Carbohydr. Polym.* 2022. V. 293. 119700.
315. Lee K.Y., Mooney D.J. Alginate: properties and biomedical applications // *Prog. Polym. Sci.* 2012. V. 37(1). P. 106-126.
316. Dimassi S., Tabary N., Chai F., Blanchemain N., Martel B. Sulfonated and sulfated chitosan derivatives for biomedical applications: A review // *Carbohydr. Polym.* 2018. V. 202. P. 382-396.
317. Hu B., Guo Y., Li H., Liu X., Fu Y., Ding F. Recent advances in chitosan-based layer-by-layer biomaterials and their biomedical applications // *Carbohydr. Polym.* 2021. V. 271. 118427.
318. Ruseska I., Fresacher K., Petschacher C., Zimmer A. Use of Protamine in Nanopharmaceuticals-A Review // *Nanomaterials (Basel)* 2021. V. 11(6). 1508.
319. Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy // *J. Cancer. Ther.* 2014. V. 10(4). P. 853-858.
320. Mantle M., Allen A. A colorimetric assay for glycoproteins based on the periodic acid/Schiff stain // *Biochem. Soc. Trans.* 1978. V. 6. P. 607-609.
321. Hess, E.L., Coburn A.F., Bates R.C., Murphy P.A. New Method for Measuring Sialic Acid Levels in Serum and Its Application to Rheumatic Fever // *J. Clin. Investig.* 1957. V. 36. P.449-455.
322. Fields R. The rapid determination of amino groups with TNBS // *Methods Enzymol.* 1972. V. 25. P. 464-468.
323. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 195. V.193. P. 265-275.
324. Dubois M., Gilse A., Hamilton S.K., Robers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // *Anal. Chem.* 1956. V. 28. P. 350-356.
325. Inagami I., Sturtevant I.M. Non-specific catalysis by α -chymotrypsin and trypsin // *J. Biol. Chem.* 1960. V. 235(4). P. 1019-1025.
326. Schwert G.W., Takenaka Y.A. A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin // *Biochim. Biophys. Acta* 1965. V. 16. P. 570-576.

327. Rick W. Chymotrypsin // *Methods of enzymatic analysis* [ed. Bergmeyer H.V.] New York: Academic. 1992. V. 2. P. 1013-1018.
328. Kakade M.L., Simons N., Liener I.E. An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. // *Cereal Chem.* 1969. V. 46(5). P. 518-526.
329. Kim R.S., LaBella F.S. Criteria for determination of lipid peroxidation in tissues: estimation in liver of mice intoxicated with carbon tetrachloride // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1987. V. 65(7). P. 1503-1506.
330. Beers R., Sizer I. A Spectrophotometric Method for Measuring the Breakdown of Hydrogen Peroxide by Catalase // *J. Biol. Chem.* 1952. V. 195. P. 276-287.
331. Kunst A., Draeger B., Ziegenhorn J. Colorimetric Methods with Glucose Oxidase and Peroxidase // *Methods Enzym. Anal.*, 3rd, Ed. Bergmeyer H.V. 1984. P. 178-185.
332. Yi X., Zimmerman M.C., Yang R., Tong J., Vinogradov S., Kabanov A.V. Pluronic-modified superoxide dismutase 1 attenuates angiotensin II-induced increase in intracellular superoxide in neurons // *Free Radic Biol. Med.* 2010. V. 49. P. 548-558.
333. *European Pharmacopoeia*. 7th Edition – Strasbourg: Council of Europe. 2011. 1000 p.
334. Bernkop-Schnürch A. Mucoadhesive systems in oral drug delivery // *Drug Discov. Today*. 2005. V. 2(1). P. 83-87.
335. Sarmiento B., Ribeiro A., Veiga F., Ferreira D. Development and validation of a rapid reversed-phase HPLC method for the determination of insulin from nanoparticulate systems // *Biomed. Chromatogr.* 2006. V. 20(9). P. 898-903.
336. Cunningham S.K., Keaveny T. V. A two-stage enzymatic method for determination of uric acid and hypoxanthine/xanthine // *Clin. Chim. Acta* 1978. V. 86. P. 133-140.
337. Hauschke D., Steinijans V., Pigeot I. *Bioequivalence Studies in Drug Development: Methods and Applications* - Chichester, UK: John Wiley and Sons. 2007. 328 p.
338. Vikhoreva G., Bannikova G., Stolbushkina P., Panov A., Drozd N., Makarov V., Gal'braikh L. Preparation and Anticoagulant Activity of a Low-Molecular-Weight Sulfated Chitosan // *Carbohydr. Polym.* 2005. V. 62. P. 327-332.
339. Tanford C., Roxby R. Interpretation of protein titration curves. Application to lysozyme // *Biochemistry* 1972. V. 11. P. 2192-2198.
340. Baker E.N., Baker H.M. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin // *Biochimie* 2009. V. 91. P. 3-10.
341. Britigan B.E., Rosen G.M., Thompson B.Y., Chai Y., Cohen M.S. Stimulated human neutrophils limit iron-catalyzed hydroxyl radical formation as detected by spin-trapping techniques // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261(36). P. 17026-17032.
342. Gutteidge I.M.C., Paterson S.K., Segal A.W., Halliwell B. Inhibition of lipid peroxidation by the iron binding protein lactoferrin // *Biochem. J.* 1981. V. 199(1). P. 259-261.

343. Baker H.M., Baker E.N. Lactoferrin and Iron: structural and dynamic aspects of binding and release // *BioMetals* 2004. V. 17. P. 209-216.
344. Anderson B.F., Baker H.M., Norris G.E., Rice D.W., Baker E.N. Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution // *J. Mol. Biol.* 1989. V. 209(4). P. 711-734.
345. Местечкина Н.М., Безбородова О.А., Ильина А.В., Левов А.Н., Клеймёнов С.Ю., Немцова Е.Р., Якубовская Р.И., Щербухин В.Д., Варламов В.П. Влияние полисахаридов на биологическую активность лактоферрина человека // *Прикладная биохимия и микробиология* 2011. Т. 47(6). С. 699-706.
346. Fan Y.F., Wang Y.N., Fan Y.G., Ma J.B. Preparation of insulin nanoparticles and their encapsulation with biodegradable polyelectrolytes via the layer-by-layer adsorption // *Int. J. Pharm.* 2006. V. 324(2). P. 158-167.
347. Zheng J., Yue X., Dai Z., Wang Y., Liu S., Yan X. Novel iron-polysaccharide multilayered microcapsules for controlled insulin release // *Acta. Biomater.* 2009. V. 5(5). P. 1499-1507.
348. Qi W., Yan X., Fei J., Wang A., Cui Y., Li J. Triggered release of insulin from glucose-sensitive enzyme multilayer shells // *Biomaterials* 2009. V. 30(14). P. 2799-2806.
349. González-Mariscal L., Tapia R., Chamorro D. Crosstalk of tight junction components with signalling pathways // *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. V. 1778 (3). P. 729-756.
350. Krizbai I.A., Deli M.A. Signalling pathways regulating the tight junction permeability in the blood-brain barrier // *Cell. Mol. Biol.* 2003. V. 49 (1). P. 23-31.
351. Lima I.S., Airoidi C. Interaction of copper with chitosan and succinic anhydride derivative – a factorial design evaluation of the chemisorption process // *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 2003. V. 229 (1-3). P. 129-136.
352. Enzyme Explorer - Pepsin // Sigma-Aldrich Co. LLC. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/pepsin.html>.
353. Salama N.N., Eddington N.D., Fasano A. Tight junction modulation and its relationship to drug delivery // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2006. V. 58 (1). P. 15-28.
354. Schwartz M.S., Chadha A. Type 2 diabetes mellitus in childhood: obesity and insulin resistance // *J. Am. Osteopath. Assoc.* 2008. V. 108 (9). P. 518-524.
355. Damgé C., Michel C., Aprahamian M., Couvreur P., Devissaguet J.P. Nanocapsules as carriers for oral peptide delivery // *J. Control. Release* 1990. V. 13 (2-3). P. 233-239.
356. Cefalu T.W., Skyler J.S., Kourides I.A., Landschulz W.H., Balagtas C.C., Cheng S.-L., Gelfand R.A. Inhaled human insulin treatment in patients with type 2 diabetes mellitus // *Ann. Intern. Med.* 2001. V. 134(3). P. 203-207.

357. Sarmiento B., Ribeiro A., Veiga F., Ferreira D., Neufeld R. Oral bioavailability of insulin contained in polysaccharide nanoparticles // *Biomacromolecules* 2007. V. 8 (10). P. 3054-3060.
358. Gao C., Moya S., Lichtenfeld H., Casoli A., Fiedler H., Donath E., Möhwald H. The decomposition process of Melamine Formaldehyde cores: the key step in the fabrication of ultrathin polyelectrolyte multilayer capsules // *Macromol. Mater. Eng.* 2001. V. 286. P. 355-361.
359. Möhwald H., Donath E., Sukhorukov G.B. In «Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials» (Ed. by Decher G., Joseph B., Schlenoff J.F., Wiley-VCH Verlag GmbH and Co KGaA. 2003. Weinheim. P. 363-392.
360. Gao C., Donath E., Möhwald H., Shen J. Spontaneous deposition of water-soluble substances into microcapsules: phenomenon, mechanism, and application // *Angew. Chem. Intern. Add.* 2002. V. 114(20). P. 3943-3947.
361. Jim Y., Liu W., Wang J., Fang J., Gao H. (Protamine/Dextran sulfate)₆ microcapsules template on biocompatible calcium carbonate microspheres // *Colloids and Surfaces A: Physiochem. Ang. Aspects.* 2009. V. 342. P. 40-45.
362. Лукашева Е.В., Айсина Р.Б., Грачева И.И., Казанская Н.Ф., Березин И.В. Свойства α -химиотрипсина, включенного в поликарбонатные микрокапсулы. Оценка роли диффузионных затруднений // *Биохимия* 1977. V. 42. P. 2013-2019.
363. Nemethy G., Scheraga H.A. Structure of water and hydrophobic bonding in proteins. 3. Thermodynamic properties of hydrophobic bonds in proteins // *J. Phys. Chem.* 1962. V. 66. P. 304-314.
364. Яминский В.В., Пчелин В.А., Амелина Е.А., Щукин Е.Д. Коагуляционные контакты в дисперсных системах. 1982. Химия. Москва. 185 с.
365. Ye S., Wang C., Liu X., Tong Z., Ren B., Zeng F. New loading process and release properties of insulin from polysaccharide microcapsules fabricated through layer-by-layer assembly // *J. Control. Release* 2006. V. 112(1). P. 79-87.
366. Stein E.W., Volodkin D.V., McShane M.J., Sukhorukov G.B. Real-time assessment of spatial and temporal coupled catalysis within polyelectrolyte microcapsules containing coimmobilized glucose and peroxidase // *Biomacromolecules* 2006. V. 7. P. 710-719.
367. Kunst A., Draeger B., Ziegenhorn J. D-Glucose. In «Methods of Enzymatic Analysis». V. 6. (Ed. H. U. Bergmeyer H.U.) VCH.Weinheim. 1984. P. 178-185.
368. Sudareva N., Popova H., Saprykina N., Bronnikov S. Structural optimization of calcium carbonate cores as templates for protein // *J. Microencapsul.* 2014. V. 31(4). P. 333-343.
369. Brange J., Owens D.R. Kang S., Volund A. Monomeric insulins and their experimental and clinical applications // *Diabetes care* 1990. V. 13(9). P. 923-954.
370. Papadopoulos S., Jurgens K.D., Gros G. Protein diffusion in living skeletal muscle fibers: dependence on protein size, fiber type, and contraction // *Biophys. J.* 2000. V. 79. P. 2084-2094.

371. Fritz H., Wunderer G. Biochemistry and applications of aprotinin, the kallikrein inhibitor from bovine organs // *Arzneimittelforschung* 1983. V. 33(4). P. 479-494.
372. Sautiere P., Briand G., Gusse M., Chevallier P. Primary structure of a protamine isolated from the sperm nuclei of the dog-fish *Scylliorhinus caniculus* // *Eur. J. Biochem.* 1981. V. 119. P. 251-255.
373. Limousin G., Gaudet J.-P., Charlet L., Szenknect S., Barthès V., Krimissa M. Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement // *Applied Geochemistry* 2007. V. 22. P. 249-275.
374. Králik M. Adsorption, chemisorption and catalysis // *Hemical Papers*. 2014. V. 68. P. 1625-1638.
375. Prajapati S., Bhakuni V., Babu K. R., Jain S. K. Alkaline unfolding and salt-induced folding of bovine liver catalase at high pH // *Eur. J. Biochem.* 1998. 255. P. 178-184.
376. Reed C. J., Bushnell S., Evilia C. Circular dichroism and fluorescence spectroscopy of cysteinyl-tRNA synthetase from halobacterium salinarum ssp. NRC-1 demonstrates that 145 group I cations are particularly effective in providing structure and stability to this halophilic protein // *PLoS One* 2014. V. 9. 89452.
377. Regnault C., Soursac M., Roch-Arveiller M., Postaire E., Hazebroucq G. Pharmacokinetics of superoxide dismutase in rats after oral administration // *Biopharm. Drug Dispos.* 1996. V. 17(2). P. 165-174.
378. Giovagnoli S., Luca G., Casaburi I., Blasi P., Macchiarulo G., Ricci M., Calvitti M., Basta G., Calafiore R., Rossi C. Long-term delivery of superoxide dismutase and catalase entrapped in poly(lactide-co-glycolide) microspheres: in vitro effects on isolated neonatal porcine pancreatic cell clusters // *J. Control. Release*. 2005. V. 107(1). P. 65-77.
379. Yasui K., Baba A. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation // *Inflamm. Res.* 2006. V. 55(9). P. 359-363.
380. Алексеев В., Корелина В., Чжан Ш. Нейропротекция новым антиоксидантом Рексод при экспериментальной глаукоме // *Клиническая офтальмология* 2008. V. 9. С. 82-84.
381. Vaneev A.N., Kost O.A., Ereemeev N.L., Beznos O.V., Alova A.V., Gorelkin P.V., Erofeev A.S., Chesnokova N.B., Kabanov A.V., Klyachko N.L. Superoxide Dismutase 1 Nanoparticles (Nano-SOD1) as a Potential Drug for the Treatment of Inflammatory Eye Diseases // *Biomedicines* 2021. V. 9(4). 396.
382. Liu W., Worms I., Slaveykova V. Interaction of silver nanoparticles with antioxidant enzymes // *Environ. Sci.: Nano* 2020. V. 7. P. 1507-1517.
383. Wagner C.E., Turner B.S, Rubinstein M., McKinley G.H., Ribbeck K. A Rheological Study of the Association and Dynamics of MUC5AC Gels // *Biomacromolecules* 2017. V.18. P. 3654-3664.
384. Bansil R., Celli J.P., Hardcastle J.M., Turner B.S. The Influence of Mucus Microstructure and Rheology in *Helicobacter pylori* Infection // *Frontiers in immunology* 2013. V. 4. 310.
385. Lai S.K., Wang Y.-Y., Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues // *Adv. Drug Del. Rev.* 2009. V. 61. P.158-171.

386. Snary D., Allen A., Pain R.H. The Structure of Pig Gastric Mucus Conformational Transitions Induced by Salt // Eur. J. Biochem. 1971. V. 24. P. 183-189.
387. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups // Archives of biochemistry and biophysics 1959. V. 82. P. 70-77.
388. Dedinaite A., Lundin M., Macakova L., Auletta T. Mucin-chitosan complexes at the solid-liquid interface: multilayer formation and stability in surfactant solutions // Langmuir 2005. V. 21(21). P. 9502-9509.
389. Fülöp Z., Gref R., Loftsson T. A permeation method for detection of self-aggregation of doxorubicin in aqueous environment // Int. J. Pharm. 2013. V. 454. P. 559-561.
390. Kiselev M.A., Gryzunov I.A., Dobretsov G.E., Komarova M.N. Size of a human serum albumin molecule in solution // Biofizika 2001. V. 46 (3). P. 423-427.
391. Posiedelik M., Markowicz-Piasecka M., Sikora J. Erythrocytes as model cells for biocompatibility assessment, cytotoxicity screening of xenobiotics and drug delivery // Chemico-Biological Interactions 2020. V. 332. 109305.
392. Li H., Zhang X., Lin X., Zhuang S., Wu Y., Liu Z., Ronga J., Zhao J. CaCO₃ nanoparticles pH-sensitively induce blood coagulation as a potential strategy for starving tumor therapy // J. Mater. Chem. B. 2020. V. 8. 1223-1234.
393. Peng H.H., Liu Y.J., Ojcius D.M., Lee C.M., Chen R.H., Huang P.R., Martel J., Young J.D. Mineral particles stimulate innate immunity through neutrophil extracellular traps containing MGB1 // Sci. Rep. 2017. V. 7. P.16628.
394. Song X., Ju H., Lasanajak Y., Kudelka M.R., Smith D.F., Cummings R.D. Oxidative release of natural glycans for functional glycomics // Nat. Methods. 2016. V.13(6). P. 528-534.

Основные публикации по теме диссертации

Статьи в рецензируемых научных изданиях

- C1. Mikhailchik E.V., Basyreva L.Yu., Gusev S.A., Panasenko O.M., Klinov D.V., Barinov N.A., Morozova O.V., Moscalets A.P., Maltseva L.N., Filatova L.Y., Pronkin E.A., Bespyatykh J.A., **Balabushevich N.G.** Activation of neutrophils by mucin-vaterite microparticles // International Journal of Molecular Sciences 2022. V. 23(18). 10579. P. 1-16.
- C2. **Balabushevich N.G.**, Kovalenko E.A., Filatova L.Y., Kirzhanova E.A., Mikhailchik E.V., Volodkin D., Vikulina A.S. Hybrid mucin-vaterite microspheres for delivery of proteolytic enzyme chymotrypsin // Macromolecular Bioscience 2022. 2200005. P. 1-8.
- C3. **Balabushevich N.G.**, Kovalenko E.A., Maltseva L.N., Filatova L.Y., Moysenovich A.V., Mikhailchik E.V., Volodkin D., Vikulina A.S. Immobilisation of antioxidant enzyme catalase on porous hybrid microparticles of vaterite with mucin // Advanced Engineering Materials 2022. 2101797. P. 1-9.

- C4. Mikhalchik E.V., Ivanov V.A., Borodina I.V., Pobeguts O.V., Smirnov I.P., Gorudko I.V., Grigorieva D.V., Boychenko O.P., Moskalets A.P., Klinov D.V., Panasenko O.M., Filatova L.Y., Kirzhanova E.A., **Balabushevich N.G.** Neutrophil activation by mineral microparticles coated with methylglyoxal-glycated albumin // *International Journal of Molecular Sciences* 2022. V. 23(14). 7840. P. 1-14.
- C5. Mikhalchik E.V., Boychenko O.P., Moskalets A.P., Morozova O.V., Klinov D.V., Basyreva L.Y., Gusev S.A., Panasenko O.M., Filatova L.Y., **Balabushevich N.G.** Stimulation of neutrophil oxidative burst by calcium phosphate particles with adsorbed mucin // *Russian Open Medical Journal* 2021. V. 10(4). P. 1-6.
- C6. Feoktistova N.A., Vikulina A.S., **Balabushevich N.G.**, Skirtach A., Volodkin D. Bioactivity of catalase loaded into vaterite CaCO₃ crystals via adsorption and co-synthesis // *Materials and Design* 2020. V. 185. 108223. P. 1-9.
- C7. Feoktistova N.A., **Balabushevich N.G.**, Skirtach A.G.D. Volodkin D., Vikulina A.S. Inter-protein interactions govern protein loading into porous vaterite CaCO₃ crystals // *Physical Chemistry Chemical Physics* 2020. V. 22. P. 9713-9722.
- C8. Mikhalchik E., **Balabushevich N.**, T. Vakhrusheva T., Sokolov A., Baykova J., D. Rakitina D., Scherbakov P., S. Gusev S., Gusev A., Kharaeva Z., Bukato O., Pobeguts O. Mucin adsorbed by *E. coli* can affect neutrophil activation in vitro // *FEBS open bio* 2019. V. 10 (2). P. 180-196.
- C9. Binevski P.V., **Balabushevich N.G.**, Uvarova V.I., Vikulina A.S., Volodkin D. Bio-friendly encapsulation of superoxide dismutase into vaterite CaCO₃ crystals: enzyme activity, release mechanism, and perspectives for ophthalmology // *Colloids and Surfaces B: Biointerface* 2019. V. 181. P. 437-449.
- C10. **Balabushevich N.G.**, Kovalenko E.A., Le-Deygen I.M., Filatova L.Y., Dmitry V., Vikulina A.S. Hybrid CaCO₃-mucin crystals: effective approach for loading and controlled release of cationic drugs// *Materials and Design* 2019. V. 182. 108020. P. 1-12.
- C11. **Balabushevich N.G.**, Kovalenko E.A., Mikhalchik E.V., Filatova L.Y., Volodkin D., Vikulina A.S. Mucin adsorption on vaterite CaCO₃ microcrystals for the prediction of mucoadhesive properties // *Journal of Colloid and Interface Science* 2019. V. 545. P. 330-339.
- C12. Vikulina A.S., Feoktistova N.A., **Balabushevich N.G.**, Skirtach A.G., Volodkin D. The mechanism of catalase loading into porous vaterite CaCO₃ crystals by co-synthesis // *Physical Chemistry Chemical Physics* 2018. V. 20. P. 8822-8831.
- C13. **Balabushevich N.G.**, Sholina E.A., Mikhalchik E.V., Filatova L.Y., Vikulina A. S., Volodkin D. Self-assembled mucin-containing microcarriers via hard templating on CaCO₃ crystals // *Micromachines* 2018. V. 9 (6). 307. P. 1-16.
- C14. **Balabushevich N.G.**, Lopez de Guerenú A.V., Feoktistova N.A., Skirtach A.G., Volodkin D. Protein-containing multilayer capsules by templating on mesoporous CaCO₃ particles: post- and pre-loading approaches // *Macromolecular Bioscience* 2016. V. 16. P. 95-105.

- C15. Киржанова Е.А., Печенкин М.А., Демина Н.Б., **Балабушевич Н.Г.** Микро- и наночастицы из альгината и хитозана для трансмукозальной доставки белка // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия 2016. Т. 57(2). С. 103-111 [Kirzhanova E.A., Pechenkin M.A., Demina N.B., **Balabushevich N.G.** Alginate–chitosan micro- and nanoparticles for transmucosal delivery of proteins // Moscow University Chemistry Bulletin 2016. Т. 71(2). Р. 127-133].
- C16. Аверин П.С., Лопес де Гереню А.В., **Балабушевич Н.Г.** Полиэлектролитные микро- и наночастицы с доксорубицином // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия 2016. Т. 57(2). С. 120-126 [Averin P.S., Lopes de Gerenyu A.V., **Balabushevich N.G.** Polyelectrolyte micro- and nanoparticles with doxorubicin // Moscow University Chemistry Bulletin 2016. V. 71(2). Р. 140-145].
- C17. **Балабушевич Н.Г.**, Печенкин М.А. Определение хитозана с использованием ортофталевого альдегида в белковых полиэлектролитных частицах // Известия Уфимского научного центра Российской академии наук 2016. Т. 3(1). С. 16-19.
- C18. **Balabushevich N.G.**, Lopez de Guerenu A.V., Feoktistova N.A., Volodkin D.V. Protein loading into porous CaCO₃ microspheres: adsorption equilibrium and bioactivity retention // Physical Chemistry Chemical Physics 2015. V. 17(4). Р. 2523-2530.
- C19. **Балабушевич Н.Г.**, Печенкин М.А., Лопес де Гереню А.В., Зоров И.Н., Михальчик Е.В., Ларионова Н.И. Послойная адсорбция биополиэлектролитов как универсальный подход для получения микрочастиц с белками // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия 2014. V. 55(3). С. 158-166 [**Balabushevich N.G.**, Pechenkin M.A., Lopes de Gerenyu A.V., Zorov I.N., Mikhalkhik E.V., Larionova N.I. Layer by layer adsorption of biopolyelectrolytes as a universal approach to fabrication of protein loaded microparticles // Moscow University Chemistry Bulletin 2014. V. 69(3). Р. 117-124].
- C20. **Балабушевич Н.Г.**, Борзенкова Н.В., Изумрудов В.А., Ларионова Н.И., Безбородова О.А., Немцова Е.Р., Якубовская Р.И. Полиэлектролитные комплексы лактоферрина и рН чувствительные микрочастицы на их основе // Прикладная биохимия и микробиология 2014. V. 50(2). Р. 232-240 [**Balabushevich N.G.**, Borzenkova N.V., Izumrudov V.A., Larionova N.I., Bezborodova O.A, Nemtsova E.R., Yakubovskaya R.I. Polyelectrolyte complexes of lactoferrin and pH sensitive microparticles on their basis // Applied Biochemistry and Microbiology 2014. V. 50(2). Р. 206-213].
- C21. Киржанова Е.А., Хуторянский В.В., **Балабушевич Н.Г.**, Харенко А.В., Демина Н.Б. Методы анализа мукоадгезии: от фундаментальных исследований к практическому применению в разработке лекарственных форм (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств 2014. Т. 3(8) С. 58-72.
- C22. **Balabushevich N.G.**, Pechenkin M.A., Shibanova E.D., Volodkin D.V., Mikhalkhik E.V. Multifunctional polyelectrolyte microparticles for oral insulin delivery // Macromolecular Bioscience 2013. V. 13(10). Р. 1379-1388.

- C23. Печенкин М.А., **Балабушевич Н.Г.**, Зоров И.Н., Изумрудов В.А., Клячко Н.Л., А. В. Кабанов А.В., Ларионова Н.И. Использование ингибиторов протеаз в составе полиэлектролитных микрочастиц для увеличения биодоступности капсулируемых белков при пероральном применении // Химико-фармацевтический журнал 2013. Т. 47(1). С. 49-56 [Pechenkin M.A., **Balabushevich N.G.**, Zorov I.N., Izumrudov V.A., Klyachko N.L., Kabanov A.V., Larionova N.I. Use of protease inhibitors in composite polyelectrolyte microparticles in order to increase the bioavailability of perorally administered encapsulated proteins // Pharmaceutical Chemistry Journal 2013. V. 47(1). P. 62-69].
- C24. **Балабушевич Н.Г.**, Изумрудов В.А., Ларионова Н.И. Белковые микрочастицы с контролируемой стабильностью, полученные послойной адсорбцией биополиэлектролитов (Обзор) // Высокомолекулярные соединения. Серия А 2012, V. 54 (7), P. 1116-1130 [**Balabushevich N.G.**, Izumrudov V.A., Larionova N.I. Protein microparticles with controlled stability prepared via layer-by-layer adsorption of biopolyelectrolytes // Polymer Science. Series A 2012. V. 54(7). P. 540-551].
- C25. Pechenkin M.A., **Balabushevich N.G.**, Zorov I.N., Staroseltseva L.K., Mikhailchik E.V., Izumrudov V.A., Larionova N. I. Design in vitro and in vivo characterization of chitosan-dextran sulfate microparticles for oral delivery of insulin // Journal of Bioequivalence & Bioavailability 2011. V. 3(10). P. 244-250.
- C26. **Балабушевич Н.Г.**, Печенкин М.А., Зоров И.Н., Шибанова Е.Д., Ларионова Н.И. Мукоадгезивные полиэлектролитные микрочастицы, содержащие рекомбинантный инсулин человека и его аналоги аспарт и лизпро // Биохимия 2011. Т. 76(3). С. 400-405 [**Balabushevich N.G.**, Pechenkin M.A., Zorov I.N., Shibanova E.D., Larionova N.I. Mucoadhesive polyelectrolyte microparticles containing recombinant human insulin and its analogs aspart and lispro // Biochemistry (Moscow) 2011. V. 76(3). P. 327-331].
- C27. **Балабушевич Н.Г.**, Вихорева Г.А., Михальчик Е.В., Ларионова Н.И. Получение и свойства рН-чувствительных наноструктурированных полиэлектролитных микрочастиц с инсулином // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия 2010. Т. 51(3). С. 178-184 [**Balabushevich N.G.**, Vikhoreva G.A., E. V. Mikhail'chik E.V., Larionova N.I. Fabrication and properties of pH-sensitive nanostructured polyelectrolyte microparticles loaded with insulin // Moscow University Chemistry Bulletin 2010. V. 65(3). P. 148-153].
- C28. Борзенкова Н.В., **Балабушевич Н.Г.**, Ларионова Н.И. Лактоферрин: физико-химические свойства, биологические функции, системы доставки, лекарственные препараты и биологически активные добавки (обзор) // Биофармацевтический журнал 2010. Т. 2(3). С. 3-19.
- C29. **Балабушевич Н.Г.**, Изумрудов В.А., Зоров И.Н., Ларионова Н.И. Создание хитозан-содержащих полиэлектролитных микрочастиц для пероральной доставки белков // Биофармацевтический журнал 2010. Т. 2(1). С. 35-41.

- C30. Larionova N.I., Zubaerova D.K., Guranda D.T., Pechyonkin M.A., **Balabushevich N.G.** Colorimetric assay of chitosan in presence of proteins and polyelectrolytes by using o-phthalaldehyde // Carbohydrate Polymers 2009. V. 75. P. 724-727.
- C31. **Balabushevich N.G.**, Larionova N.I. Protein-loaded microspheres prepared by sequential adsorption of dextran sulphate and protamine on melamine formaldehyde core // Journal of Microencapsulation 2009. V. 26(7). P. 571-579.
- C32. Немцова Е.Р., Ларионова Н.И., Безбородова О.А., Кармакова Т.А., **Балабушевич Н.Г.**, Печенкин М.А., Якубовская Р.И. Антиканцерогенное и противоопухолевое действие соевого ингибитора протеиназ типа Баумана-Бирк в модельных системах // Вестник Южного научного центра РАН 2009. Т. 5(1). С. 18-26.
- C33. **Balabushevich N.G.**, Lebedeva O.V., O. I. Vinogradova O.I., Larionova N.I. Polyelectrolyte assembling for protein microencapsulation // Journal of Drug Delivery Science and Technology 2006. V. 16(4). P. 315-319.
- C34. Alexandrova V.A., **Balabushevich N.G.**, Bondarenko G.N., Domnina N.S., Larionova N.I. Water soluble chitosan conjugates with plant antioxidants and polyelectrolyte complexes on their basis // Journal of Drug Delivery Science and Technology 2006. V. 16(4). P. 279-283.
- C35. **Balabushevich N.G.**, Sukhorukov G.B., Larionova N.I. Polyelectrolyte multilayer microspheres as carriers for bienzyme system: preparation and characterization // Macromolecular Rapid Communications 2005. V. 26(14). P. 1168-1172.
- C36. **Балабушевич Н.Г.**, Зимина Е.П., Ларионова Н.И. Включение каталазы в полиэлектролитные микросферы из меламинформальдегида, декстрансульфата и протамина // Биохимия 2004. Т. 69(7). С. 937-944 [**Balabushevich N.G.**, Zimina E.P., Larionova N.I. Encapsulation of catalase in polyelectrolyte microspheres composed of melamine formaldehyde, dextran sulfate, and protamine // Biochemistry (Moscow) 2004. V. 69. P. 763-769].
- C37. **Балабушевич Н.Г.**, Ларионова Н.И. Получение и характеристика полиэлектролитных частиц с белком // Биохимия 2004. Т. 69(7). С. 930-936 [**Balabushevich N.G.**, Larionova N.I. Fabrication and characterization of polyelectrolyte microparticles with protein// Biochemistry (Moscow) 2004. V. 69. P. 757-762].
- C38. Михальчик Е.В., Коркина Л.Г., Ануров М.В., Титкова С.М., **Балабушевич Н.Г.** Эффекты биологически активной добавки Инсол с антипротеиназной активностью в модели острого воспаления // Вестник Российского государственного медицинского университета 2004. Т. 7(38). С. 71-74.
- C39. Володькин Д.В., **Балабушевич Н.Г.**, Сухоруков Г.Б., Ларионова Н.И. Включение белков в полиэлектролитные микрочастицы путем послойной адсорбции полиэлектролитов на агрегатах белка // Биохимия 2003. Т. 68(2). С. 283-283 [Volodkin D.V., **Balabushevitch N.G.**, Sukhorukov G.B.,

Larionova N.I. Inclusion of proteins into polyelectrolyte microparticles by alternative adsorption of polyelectrolytes on protein aggregates // *Biochemistry (Moscow)* 2003. V. 68(2). P. 236-241].

C40. **Balabushevich N.G.**, Tiourina O.P., Volodkin D.V., Larionova N.I., Sukhorukov G.B. Loading the multilayer dextran sulfate/protamine microsized capsules with peroxidase // *Biomacromolecules* 2003. V. 4. P. 1191-1197.

C41. Volodkin D.V., **Balabushevitch N.G.**, Sukhorukov G.B., Larionova N.I. Model systems for controlled protein release: pH-sensitive polyelectrolyte microparticles // *S.T.P. Pharma sciences* 2003. V. 13(3). P. 163-170.

C42. **Балабушевич Н.Г.**, Сухоруков Г.Б., Ларионова Н.И. Включение белков в полиэлектролитные микрокапсулы из декстрансульфата, протамина и меламинформальдегида // *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия* 2002. Т. 43(6). С. 374-377.

C43. Larionova N.I., Volodkin D.V., **Balabushevitch N.G.**, Sukhorukov G.B., Möhwald H. Microcapsules responsive to physiological pH fabricated by layer-by-layer adsorption of polyelectrolytes on protein aggregates // *Scientia Pharmaceutica* 2001. V. 69. P. 175-176.

C44. **Balabushevitch N.G.**, Sukhorukov G.B. Moroz N.A., Larionova N. I., Volodkin D.V., Donath E, Möhwald H. Encapsulation of proteins by layer-by-layer adsorption of polyelectrolytes onto protein aggregates: Factors regulating the protein release // *Biotechnology and Bioengineering* 2001. V. 76(3). P. 207-213.

C45. Гладышева И.П., **Балабушевич Н.Г.**, Мороз Н.А., Ларионова Н.И. Выделение и характеристика соевого ингибитора типа Баумана-Бирк из различных источников // *Биохимия* 2000. Т.65(2). С. 238-244 [Gladysheva I., **Balabushevich N.**, Moroz N., Larionova N. Isolation and characterization of soybean Bowman-Birk inhibitor from different sources // *Biochemistry (Moscow)* 2000. V. 65(2). P. 198-203.

C46. Ларионова Н.И., **Балабушевич Н.Г.**, Гладышева И.П., Мороз Н.А, Казанская Н.Ф., Полехина О.В., Донецкий И.А. Природные ингибиторы протеиназ как основа для создания новых лекарственных средств // *Вопросы медицинской химии* 1994. Т. 40(3). С. 25-31.

Патент

П1. Патент РФ № 2300369, А61К9/50, 10.06.2007. Способ получения полиэлектролитных микрочастиц, содержащих инкапсулируемое вещество, чувствительных к изменению состава окружающей среды. Ларионова Н.И., **Балабушевич Н.Г.** [WO/2007/075118, 22.11.2006, PCT/RU2006/000621 Method for producing polyelectrolytic microparticles which contain an encapsulated substance and are sensitive to the environment composition change. Larionova N.I., **Balabushevich N.G.**]

Благодарности

Автор выражает благодарность ныне покойным проф., д.х.н. Ларионовой Н.И., д.х.н. Казанской Н.Ф. и проф., д.х.н. Изумрудову В.А., внесшим неоценимый вклад в исследование; проф. Сухорукову Г.Б. за организацию работ по капсулированию белков с использованием послойной адсорбции полиэлектролитов в 2000 - 2005 г.; д.б.н. Михальчик Е.В. и д.б.н. Старосельцевой Л.К. за проведение и обсуждение исследований частиц *in vitro* и *in vivo*; к.х.н. Володькину Д.В. за долговременное сотрудничество по изучению мультислойных полиэлектролитных частиц с белками; к.б.н. Викулиной А.С. за конструктивное обсуждение и интерпретацию результатов микрокапсулирования с использованием ватерита; д.х.н., проф. Еремееву Н.Л. за поддержку и консультации при написании диссертации; всем соавторам публикаций, сотрудникам кафедры химической энзимологии, соискателям, дипломникам и студентам, участвовавшим в представленной работе.