

УДК 544.2+544.7

ФОРМИРОВАНИЕ СТРУКТУР ЯДРО–ОБОЛОЧКА С ВОЗМОЖНОСТЬЮ рН-ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

© 2023 г. А. О. Кузнецов¹, Ю. Н. Власичева¹, Е. В. Ленгерг², А. В. Ермаков², *

¹Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,
Миусская площадь, 9, стр. 6, Москва, 125047 Россия

²Первый Московский государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), институт молекулярной тераностики,
ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, Москва, 119991 Россия

*e-mail: ermakov_a_v_2@staff.sechenov.ru

Поступила в редакцию 05.04.2023 г.

После доработки 23.04.2023 г.

Принята к публикации 27.04.2023 г.

Разработка систем доставки лекарственных веществ является важным трендом современной биомедицины. За последние пять лет наблюдается тенденция к усложнению разрабатываемых систем доставки лекарств с получением сложных многокомпонентных носителей, с целью совершенствования направленности и селективности их действия. Для этого используются различные свойства тканей, характерных для того или иного участка организма, что может быть использовано для разделения действия носителей. Одним из таких факторов служит рН среды, который строго регулируется организмом и является константой в той или иной области организма. В связи с этим в данной работе мы разрабатываем подход для формирования комплексных частиц со структурой ядро-оболочка на основе мезопористых частиц карбоната кальция и кремнезема класса AMS-6. Исследованы загрузочная способность и кинетика высвобождения модельного вещества (конъюгата красителя TRITC с бычьим сывороточным альбумином BSA) из полученных комплексных частиц. Полученные в работе носители имеют перспективы применения в качестве лекарственных носителей с рН-зависимой кинетикой высвобождения инкапсулированного препарата.

DOI: 10.31857/S0023291223600207, EDN: ZQDJUG

ВВЕДЕНИЕ

Стремительная модернизация сферы здравоохранения и внедрение передовых технологий помогли повысить эффективность лечения и вывести качество жизни пациентов на новый уровень. Однако увеличение продолжительности жизни также поспособствовало и увеличению числа неинфекционных хронических заболеваний. Рак, по данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), является одной из ведущих причин смертности в мире, унесших почти 10 млн жизней за 2020 г. В настоящее время испытываются различные новые подходы к лечению онкологий, где свою эффективность демонстрирует таргетная терапия – использование контейнеров, содержащих лекарственное вещество, для целенаправленной доставки в опухоль или опухолевые клетки. Применение микрочастиц показало увеличенную эффективность самого препарата за счет повышения взаимодействия его молекул с патогенными клетками, а также снижение нежелательных эффектов, улучшенную фармакодина-

мику и проницаемость через физиологические барьеры [1–4]. Различные неорганические частицы нано- и субмикронного размера, включая оксиды металлов, диоксид кремния, металл-органические комплексы и другие, были широко изучены в качестве лекарственных носителей благодаря ряду параметров, включая высокую стабильность, биосовместимость, способность к деградации и поверхностному модифицированию [5–8]. Особое место занимает разработка пористых материалов благодаря уникальной возможности управления физико-химическими характеристиками и свойствами этих материалов. В то же время контролируемыми свойствами позволяют создавать многофункциональные материалы, позволяющие одновременно осуществить биовизуализацию, сенсорику, а также их терапевтическое применение [9, 10]. Применение направленного транспорта для онкотерапии может значительно повысить качество диагностики и эффективность методов лечения.

Анализ исследований, проведенных за последние 10 лет, показывает, что около 0.7% частиц,

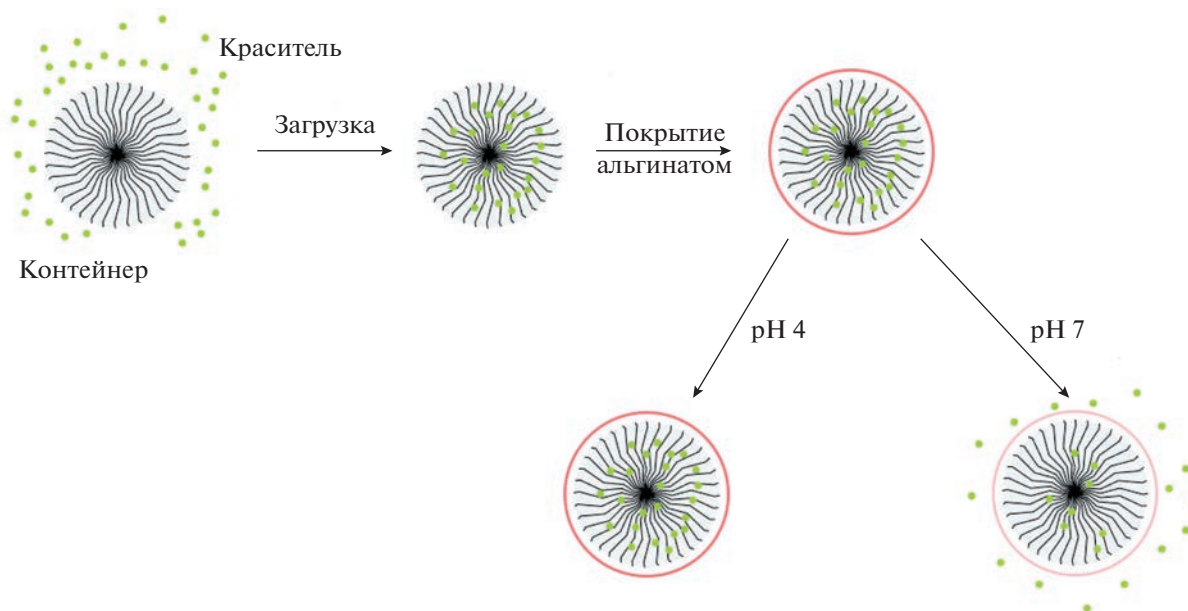


Рис. 1. Схема покрытия микрочастиц CaCO_3 pH-чувствительным полимером.

введенных внутривенно, попадают внутрь целевой опухоли [11]. Это наталкивает на мысль о создании новых контейнеров (достаточно долгий и дорогостоящий процесс) или модернизации уже существующих. Преимущественное снижение эффективности доставки происходит благодаря клеткам иммунной системы – фагоцитам и макрофагам, которые поглощают лекарственные носители в результате фагоцитоза [12]. Снижению иммунного ответа может способствовать дополнительное покрытие микрочастиц биосовместимой гидрофильной оболочкой. Частицы, загруженные лекарственным веществом, модифицируют различными полимерами, что позволяет выполнить ряд задач, включая снижение возможного токсического эффекта на нецелевые ткани организма, повышение его устойчивости к действию организма, повышение времени циркуляции в кровотоке и другие (рис. 1).

Примечательно, что такая процедура способствует и получению новых свойств контейнеров за счет природы и физико-химических особенностей полимера – устойчивости или чувствительности к температуре, свету, ультразвуку, действию эндогенных веществ (например, ферментов) и pH [13–19].

Одной из важнейших характеристик для живых систем является pH. Все клеточные структуры зависят от кислотности, поскольку она влияет на осуществление всех биохимических процессов. Водородный показатель всех частей тела и физиологических жидкостей регулируется кислотно-щелочным гомеостазом. Так, pH крови контролируется преимущественно гидрокарбонатным буфером и

варьируется в пределах 7.36–7.42. Воспаленные ткани и опухоли показывают сниженные, по сравнению со здоровыми тканями, значения [20, 21]. На этом и основан метод модифицирования поверхности контейнеров pH-чувствительным полимером, способным разлагаться в условиях низких pH. В силу небольшого различия в кислотности воспаленной и здоровой тканей такие системы доставки не показывают желаемых результатов. Эндосомы и лизосомы клеток обладают пониженной кислотностью среды по сравнению с внеклеточным пространством (pH = 4.5–5.5), что ведет к необходимости получения носителей с устойчивостью к пониженным pH для избежания высвобождения лекарственного препарата при эндоцитозе здоровыми клетками. Другим вариантом применения частиц с такой pH-зависимостью является пероральное введение, которое требует от частиц преодоления желудочного тракта, обладающего пониженной кислотностью среды, с последующим всасыванием лекарственных носителей и высвобождением в кишечнике при нормальном физиологическом уровне pH (7.4). В связи с этим, целью данной работы является разработка структур ядро-оболочка на основе мезопористых частиц и pH-чувствительного полимера, позволяющих осуществлять высвобождение захваченного в поры вещества в результате действия кислотной среды (pH < 5). В качестве pH-чувствительного материала для покрытия необходимо использовать биоразлагаемые полимеры с низкой токсичностью и высокой биосовместимостью [22–24]. Таким условиям удовлетворяет полисахарид морских водорослей, используемый как в медицине и

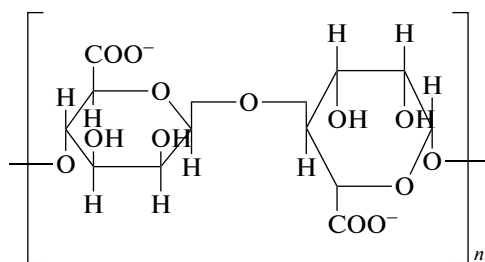


Рис. 2. Схема строения молекулы альгината.

фармацевтической промышленности, так и в пищевой промышленности, альгинат натрия [25–27]. Альгинат представляет собой анионный сополимер, состоящий из блоков β -(D)-маннуровой кислоты (M) и α -(L)-гулурановой кислоты (G) (рис. 2). Обладает способностью к гелеобразованию при комнатной температуре, нетоксичен, биосовместим и мукоадгезивен.

В результате ионообменного процесса противоион натрия, имеющий более низкое сродство к альгинату, замещается на кальций, образуя при этом гель: в ходе взаимодействия карбоксильных групп альгинатных (G)-блоков с катионами кальция альгинатные цепи сшиваются, образуя структуру “яичного лотка” [28, 29].

Исследование направлено на получение мезопористых частиц с возможностью pH-чувствительного высвобождения инкапсулированных в них соединений, что достигается путем формирования покрытия из pH-чувствительного полимера.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

Дигидрат хлорида кальция ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), альгиновая кислота (99.0%) и карбонат натрия (Na_2CO_3) были приобретены в фирме Sigma-Aldrich, США. Бычий сывороточный альбумин (BSA, 6 кДа, Sigma-Aldrich), тетраметилпродамин (TRITC, Sigma Aldrich), N-лауроил-L-аланин ($\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{NO}_3$, Sigma-Aldrich), (3-аминопропил) триэтоксисилан $\text{C}_9\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{Si}$ (Sigma-Aldrich), тетраэтилортосиликат $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{SiH}$ (Sigma-Aldrich). Все использованные в работе реактивы были класса чистоты “х.ч.”. Во всех экспериментах была использована деионизированная вода с использованием системы Milli-Q water (18.2 M Ω см).

Приготовление микрочастиц карбоната кальция

К 2 мл 1 М Na_2CO_3 и 2 мл деионизированной воды на магнитной мешалке (400 об./мин) при температуре 35°C были добавлены 2 мл 1 М раствора CaCl_2 . Раствор перемешивался в течение 45 с, затем полученная суспензия подвергалась

центрифугированию (1.5 мин; 2000 об./мин). Надосадочный раствор был декантирован, добавлена деионизированная вода. После была проведена процедура промывки: пробирки были погружены в ультразвуковую ванну на 3 мин, затем в центрифугу (1.5 мин; 2000 об./мин), затем декантировали надосадочный раствор и добавляли деионизированную воду, процедура проводилась 3 раза. После проведения всех процедур все частицы были перелиты в колбу на 50 мл и доведены деионизированной водой до 40 мл, чтобы полученная концентрация частиц в растворе составляла 1 мг/мл.

Загрузка конъюгата BSA–TRITC в микрочастицы ватерита и покрытие pH-чувствительным полимером

Для проведения синтеза конъюгата TRITC (1 мг) растворяли в этаноле (5 мл). После этого раствор TRITC добавляли к раствору бычьего сывороточного альбумина (20 мл, 4 мг/мл, карбонатно-бикарбонатный буфер, pH 8.5). Смесь перемешивали в течение 12 ч при температуре 4°C. Затем TRITC, конъюгированный с раствором BSA, отмывали от избытка реагентов экстенсивным диализом в деионизированной воде в течение 4 сут.

0.075 г альгината были перемешаны в 10 мл деионизированной воды до полного растворения. 0.5 мг конъюгата BSA–TRITC были растворены в 5 мл деионизированной воды. Полученная концентрация BSA–TRITC – 0.1 мг/мл. Для проведения оценки грузочной способности контейнеров были отобраны по 1 мл микрочастиц ватерита в 4 пробирки на 2 мл и добавлены по 1 мл 0.1 мг/мл раствора конъюгата BSA–TRITC. Пробирки, закрепленные на ротаторе, были загружены в морозильную камеру до полной заморозки. Загрузка модельного вещества внутрь частиц происходит при замерзании в морозильной камере. При кристаллизации раствора молекулы конъюгата BSA–TRITC, не попавшие в кристаллическую решетку воды, концентрируются по фронту кристаллизации и, в конечном итоге, оказываются сконцентрированы в порах частиц. Таким образом, проникая глубже к центру частиц ватерита, раствор с конъюгатом полностью замещает остаточную воду. После разморозки, пробы были отправлены в центрифугу на 2 мин при 2000 об./мин, затем остатки конъюгата BSA–TRITC вместе с водой были декантированы в дополнительные пробирки и сохранены для количественного анализа. Затем полученную суспензию осаждали центрифугированием (2000 об./мин, 3 мин) и промывали деионизированной водой. Процедуру промывания повторяли 3 раза. Затем 1 мл раствора альгината натрия был добавлен в загруженные частицы и отправлен в шейкер на 5 мин. Смесь перемешивали в течение пяти минут и после этого пробы были промыты дважды от неадсорбированного альгината на-

трия путем центрифугирования суспензии (1.5 мин, 2000 об./мин), декантирования надосадочного раствора (фильтрат сохраняли для оценки наиболее эффективной загрузочной способности), добавления 1 мл деионизированной воды. После промывки для гелификации альгината натрия на микрочастицах были добавлены различные объемы раствора CaCl_2 (50 и 70 мкл) концентрацией 1 М. После этого частицы были погружены в различные среды (нейтральная среда – рН 7.4 и кислая среда рН 4.5).

Отбор среды для оценки высвобождения модельного вещества производился через 30 мин, 1 ч и 6 дней после погружения частиц в среду: были отобраны 100 мкл среды из каждой пробирки.

Для оценки загрузки модельного вещества в мезопористые частицы была проанализирована надосадочная жидкость методом спектрофотометрии. По спектрам флуоресценции конъюгата BSA–TRITC была построена градуировочная кривая с линейной зависимостью, после чего концентрация конъюгата в надосадочной жидкости оценивалась по полученной зависимости. Таким образом, масса конъюгата, оставшаяся в надосадочной жидкости (с учетом известного объема и начальной концентрации), считалась как незагруженная, а остальная масса, соответственно, считалась загруженной в поры частиц.

Оценка кинетики высвобождения инкапсулированного модельного вещества была проведена путем экспозиции суспензии частиц в деионизированной воде с отбором 100 мкл надосадочной жидкости в заданные промежутки времени. Для сохранения концентрации частиц в суспензии обратно в пробирку добавлялось 100 мкл воды, что учитывалось при пересчете полученных данных в кумулятивное высвобождение.

Синтез частиц кремнезема

В качестве частиц кремнезема выбраны частицы класса AMS, получаемые методом темплатирования с помощью анионного поверхностно-активного вещества (ПАВ) при гидротермальном синтезе. Подробно протокол, использованный в данной работе, рассмотрен в литературе ранее [30, 31]. Для синтеза AMS-6 в качестве темплатного ПАВа был использован N-лауроил-L-аланин ($\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{NO}_3$); тетраэтилортосиликат ($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$) $_4\text{Si}$ в качестве источника кремнезема; (3-аминопропил) триэтоксисилан ($\text{C}_9\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{Si}$) в качестве соединения, направляющего процесс формирования структуры, за счет сильного взаимодействия с анионной группой молекул ПАВа и ковалентной связи с кремнеземом. В ходе синтеза водный раствор $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{NO}_3$ в концентрации 5 мг/мл был выдержан при 80°C в течение суток с применением обратного холодильника. Затем был до-

бавлен $\text{C}_9\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{Si}$ до достижения концентрации 5 мг/мл и тщательно перемешан, а через 5 мин после этого было добавлено соединение ($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$) $_4\text{Si}$ до достижения концентрации 25.5 мг/мл. Полученный раствор перемешивали в течение 30 мин при 80°C в круглодонной колбе, затем раствор был охлажден до комнатной температуры и перемешивался в течение суток. Полученный раствор без дополнительного перемешивания был помещен в закрытый автоклав с тефлоновым покрытием общим объемом 50 мл и выдержан при температуре 100°C в течение 6 ч. Полученную в результате этого процесса суспензию центрифугировали и сушили при комнатной температуре.

Загрузка конъюгата BSA–TRITC в микрочастицы кремнезема

Для загрузки полученных частиц кремнезема конъюгатом BSA–TRITC был использован метод испарения из суспензии жидкой фазы в присутствии инкапсулируемого соединения. Для этого полученные частицы кремнезема были суспендированы в растворе конъюгата BSA–TRITC в метиловом спирте. Затем полученная суспензия нагревалась в роторном испарителе до 60°C до полного испарения жидкой фазы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пористые частицы карбоната кальция были синтезированы по методике, опубликованной в работе [32]. Данный протокол позволил получить сферические частицы карбоната кальция в полимерной модификации ватерит со средним размером частиц 2.5 ± 0.5 мкм (рис. 3а).

Мезопористые частицы кремнезема были синтезированы согласно протоколу, опубликованному в работах [30, 31, 33]. Согласно литературным данным размер пор частиц, полученных по описанному протоколу, составляет 4.5 ± 0.3 нм. Согласно результатам, полученным методом РЭМ, средний размер частиц составляет 550 ± 48 нм (рис. 3б).

Альгинат натрия является слабым полиэлектролитом и степень его ионизации зависит от рН среды, что обеспечивает ему рН-чувствительное поведение. Данные свойства делают альгинат натрия перспективной платформой для создания лекарственных носителей в рН-чувствительных системах доставки лекарств в качестве функционального покрытия. В данной работе мы используем в качестве носителей мезопористые частицы карбоната кальция, служащие для загрузки в них низкомолекулярных модельных веществ и способные к быстрому и спонтанному их высвобождению за счет десорбции вещества из пор. Заложенная в основу работы идея состоит в том, чтобы обеспечить быстрое высвобождение модельных веществ при физиологическом уровне рН (7.4), со-

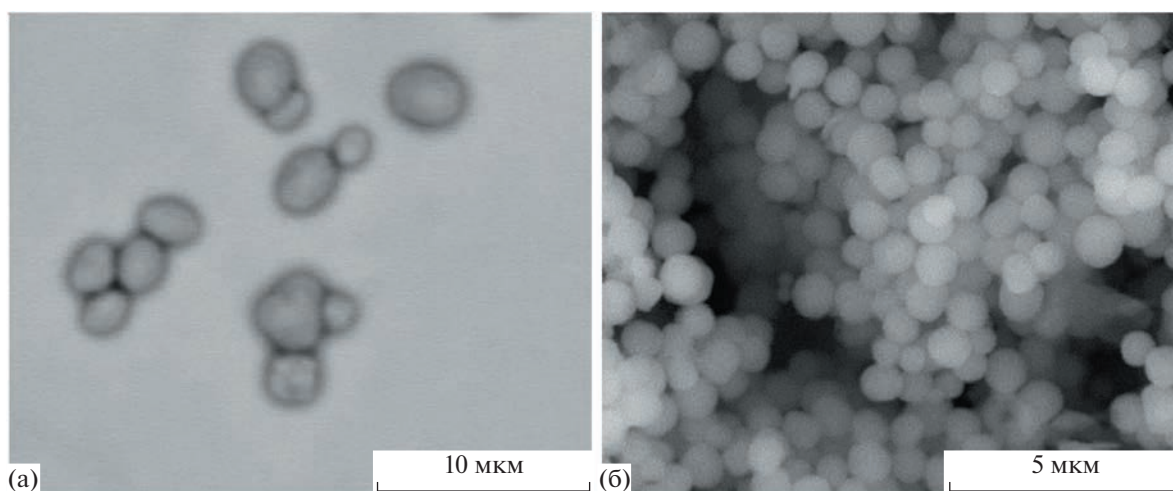


Рис. 3. Изображения, полученные методом РЭМ, микрочастиц карбоната кальция (а) и субмикронных частиц кремнезема класса AMS-6 (б).

ответствующим рН крови человека, при надежной инкапсуляции в условиях кислой среды при рН ниже 5, что обеспечит замедление процесса высвобождения инкапсулированного вещества в нецелевых участках организма, например, в фагоцитарной мононуклеарной системе.

Процесс формирования оболочки из альгината натрия на поверхности мезопористых частиц является принципиально одинаковым для обоих использованных в этой работе типов частиц (частицы ватерита и кремнезема) и предполагает ресуспендирование мезопористых частиц в растворе альгината натрия. При этом за счет развитой поверхности мезопористых частиц на них адсорбировались молекулы альгината натрия. Последующие циклы промывания деионизированной водой позволяли удалить излишки раствора альгината натрия из надосадочной жидкости, в то время как адсорбированная оболочка на поверхности частиц как ватерита, так и кремнезема оставалась устойчивой в пределах нескольких часов, что было зафиксировано методом динамического рассеяния света путем оценки размера и дзета-потенциала частиц. Так, дзета-потенциал частиц ватерита составлял ~ 5 мВ, в то время как после нанесения на частицы альгинатной оболочки значение дзета-потенциала падало до -31 мВ и не менялось за время контроля (6 ч), более того, обеспечивало высокую коллоидную стабильность. Также метод динамического рассеяния света позволил установить увеличение среднего диаметра частиц на 142 ± 28 нм, что может быть отнесено к толщине сформированной оболочки. Кроме того, ожидается, что постепенный ионообменный процесс приведет к связыванию ионов кальция из частиц за счет спонтанного высвобождения с поверхности частиц, приводя тем самым к постепенному гелифицированию альгината натрия и придавая

ему дополнительную устойчивость. Затем путем добавления двухвалентных ионов кальция, для чего был использован раствор хлорида кальция концентрацией 1 М, осуществлялось сшивание альгината натрия за счет G-блоков в его структуре, что позволяло получить высокостабильную оболочку на поверхности мезопористых частиц, формируя структуру ядро–оболочка.

Для получения оболочки оптимальной толщины и вязкости были исследованы серии образцов с различными концентрациями альгината натрия, использованного для адсорбции на поверхность мезопористых частиц, а также различными объемами сшивающего агента (хлорид кальция).

Так как целью формирования таких структур является применение их в качестве лекарственных носителей, то главным критерием оценки качества сформированной оболочки является динамика релиза инкапсулированного в ядро вещества. С учетом поставленной цели в виде быстрого (в пределах трех часов) высвобождения при физиологическом уровне рН и стабильном удержании при рН ниже 5, с целью повышения стабильности к действию мононуклеарной фагоцитарной системы, был проведен анализ полученных частиц ядро–оболочка.

Также в ходе работы были проанализированы морфология полученных структур и толщина оболочек методом сканирующей электронной микроскопии, а загрузка и высвобождение конъюгата BSA–TRITC методом спектрофлуориметрии на длине волны 571 нм.

Дополнительным методом контроля процесса загрузки модельного вещества в поры частиц служила однократная их промывка после процесса загрузки. Частицы были промыты деионизированной водой без дополнительного времени экспо-

зиции, и нулевая концентрация BSA–TRITC в полученном растворе свидетельствовала о медленном процессе десорбции конъюгата из частиц и, соответственно, о нахождении конъюгата BSA–TRITC в порах, тогда как высокая концентрация конъюгата свидетельствовала о том, что большая его часть осталась на поверхности частиц, что расценивалось как незагруженное вещество.

В данной работе мы рассматриваем два типа частиц, для каждого из которых разработан и использован свой метод загрузки.

В случае частиц карбоната кальция мы базировались на работе [34] и применили загрузку, опосредованную заморозкой суспензии частиц в растворе целевого модельного вещества при постоянном перемешивании. В этом случае после полного замораживания суспензии следовал процесс размораживания, центрифугирования и промывки частиц деионизированной водой. Количественная оценка процесса загрузки была проведена путем отбора надсадочной жидкости сразу после размораживания и центрифугирования суспензии. Спектрофотометрический анализ на длине волны 571 нм позволил оценить количество конъюгата BSA–TRITC, оставшегося в растворе после загрузки частиц, и, таким образом, по разнице с известной начальной концентрацией конъюгата в растворе сделать вывод о количестве загруженного вещества. Дополнительно из общего количества загруженного вещества было вычтено количество конъюгата в надсадочной жидкости после однократной промывки без длительной экспозиции в воде. Эти данные позволили оценить загрузочную способность (*DLC*) как отношение массы загруженного конъюгата к массе использованных для загрузки частиц:

$$DLC = \frac{m_{\text{загруженное вещество}}}{m_{\text{частиц до загрузки}}} \times 100\%$$

Учитывая, что для загрузки было использовано 10 мг сухой навески частиц карбоната кальция, что при их размере в 2.5 мкм соответствует 5×10^6 частиц, и полученную массу конъюгата BSA–TRITC, который оказался загружен в поры частиц, мы получили загрузочную способность в 9 мас. %. И с учетом начальной концентрации конъюгата 2 мг/мл в 2 мл суспензии частиц мы также получаем эффективность загрузки 22.5% (выраженную как отношение массы загруженного вещества, к общей массе конъюгата в суспензии до загрузки).

В случае микрочастиц кремнезема класса AMS-6 был использован принципиально иной подход, однако также основанный на концентрировании молекул загружаемого вещества на границе раздела поверхности твердой частицы и раствора. С этой целью был использован метод испарения жидкой фазы из суспензии частиц в растворе модельного вещества (конъюгат BSA–TRITC) в

метиловом спирте при температуре в 60°C. Использование метанола, благодаря его свойствам сильного растворителя, не только позволяет получить суспензии с более высокой дисперсностью частиц кремнезема в сравнении с водным раствором, но и за счет высокой летучести обеспечивает возможность процесса загрузки за счет резкого (в течение 20 мин) испарения жидкой фазы. При таком подходе загрузка считается завершенной после полного испарения жидкой фазы, и в этом случае вывод о локализации BSA–TRITC в оставшейся сухой навеске делается путем однократной промывки деионизированной водой без продолжительной экспозиции в воде. Конъюгат BSA–TRITC, обнаруженный в надсадочной жидкости после данного цикла промывки, вероятно, не был инкапсулирован в поры и находился на поверхности частиц после испарения метанола. В этом случае процесс загрузки конъюгата BSA–TRITC в поры частиц кремнезема определяется несколькими факторами: во-первых, массовой долей модельного загружаемого вещества в суспензии частиц относительно массы частиц. Загрузочная способность использованных нами частиц кремнезема класса AMS-6 составляет около 28%, что было установлено экспериментально с использованием описанного выше критерия концентрации конъюгата BSA–TRITC после однократной промывки загруженных образцов. Для этого были исследованы профили высвобождения загруженного BSA–TRITC в деионизированной воде в течение 3 ч. Показано, что при загрузке BSA–TRITC с массовой долей в диапазоне 2–28 мас. % от массы использованных частиц кремнезема наблюдалось постепенное высвобождение с линейной зависимостью вплоть до 65% в течение часа (рис. 4). Короткий промежуток времени оценки доли высвобожденного конъюгата BSA–TRITC обусловлен прежде всего коротким временем циркуляции лекарственных носителей в крови (менее 15 мин). Однако дальнейшее повышение массовой доли инкапсулируемого BSA–TRITC приводит к появлению фракции этого BSA–TRITC в надсадочной жидкости после процедуры промывания частиц, а также нелинейному профилю высвобождения, что свидетельствует о том, что дальнейшее повышение доли конъюгата BSA–TRITC нецелесообразно и приводит к его адсорбции на поверхности частицы (рис. 4а). В свою очередь, pH внешней среды кардинальным образом влияет на долю высвобожденного конъюгата BSA–TRITC в единицу времени из частиц карбоната кальция, что связано с постепенным растворением частиц при пониженном уровне pH среды.

На следующем этапе работы мезопористые частицы, загруженные модельным веществом BSA–TRITC, были покрыты гидрогелевыми оболочками из альгината натрия с различными параметра-

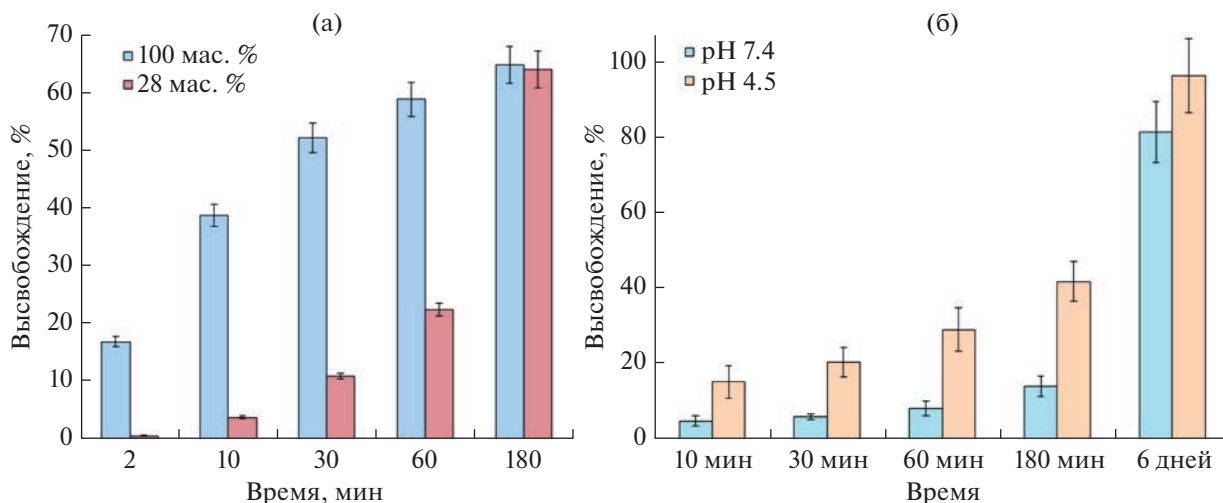


Рис. 4. Профили высвобождения модельного вещества (конъюгат BSA–TRITC) из пористых частиц кремнезема класса AMS-6 в деионизированной воде при различных массовых процентах загруженного BSA–TRITC (а); и из частиц ватерита при различных значениях pH среды (б).

ми нанесения для подбора оптимальной оболочки по протоколу, описанному выше.

Исследование дзета-потенциала полученных образцов методом динамического рассеяния света показало изменение потенциала со среднего значения в 5 мВ (CaCO_3) до -31 мВ, что является свидетельством успешного формирования альгинатных оболочек на поверхности частиц. Несмотря на то, что дзета-потенциал полученных частиц недостаточен для обеспечения коллоидной стабильности системы, при нанесении оболочек с использованием раствора альгината натрия концентрациями 5 и 7.5 мг/мл наблюдался невысокий уровень агрегации частиц, что было установлено путем оптической микроскопии и подсчета среднего числа частиц в агрегатах по нескольким кадрам.

Стоит отметить, что отрицательное значение дзета-потенциала крайне важно для частиц, претендующих на применение в качестве лекарственных носителей для системной доставки лекарств, так как при положительном заряде происходит электростатическое взаимодействие с клетками крови, приводящее к образованию тромбов. Однако при более высоких концентрациях раствора альгината натрия (10 мг/мл), использованного для формирования оболочек, наблюдалась повышенная агрегация частиц. Косвенным критерием оценки формирования оболочки являлась также стабильность полиморфной модификации карбоната кальция. Так как ватерит является нестабильной полиморфной модификацией карбоната кальция и имеет тенденцию к перекристаллизации в форму кальцита, это дает возможность по времени процесса перекристаллизации оценить проницаемость оболочки. При наименьшей из исследованных концентраций (5 мг/мл) наблюда-

лась быстрая перекристаллизация частиц карбоната кальция (в течение суток), что может быть обнаружено методом РЭМ в виде частиц с кубической кристаллической решеткой (рис. 5), что позволяет, во-первых, заключить о недостаточности толщины оболочки в результате высокого массообмена между окружающим раствором и частицами и, во-вторых, показывает несостоятельность одной из функций формируемого покрытия, а именно функции повышения стабильности получаемой системы. Таким образом, концентрация альгината натрия 7.5 ± 0.5 мг/мл предположена как оптимальная.

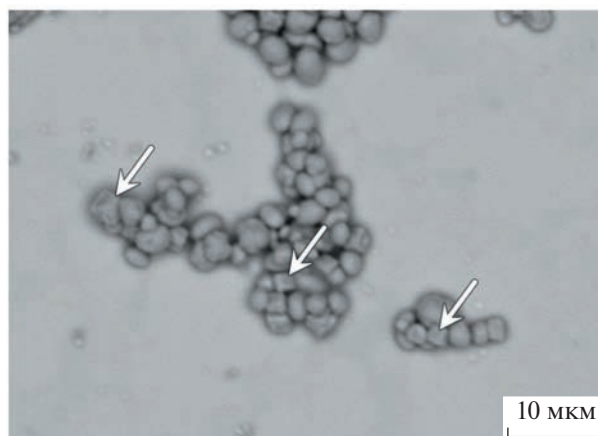


Рис. 5. Изображение, полученное методом РЭМ, частиц карбоната кальция, покрытых альгинатом натрия при концентрации 5 мг/мл после экспозиции в деионизированной воде. Стрелками показаны кубические частицы, которые могут быть отнесены к кристаллам кальцита.

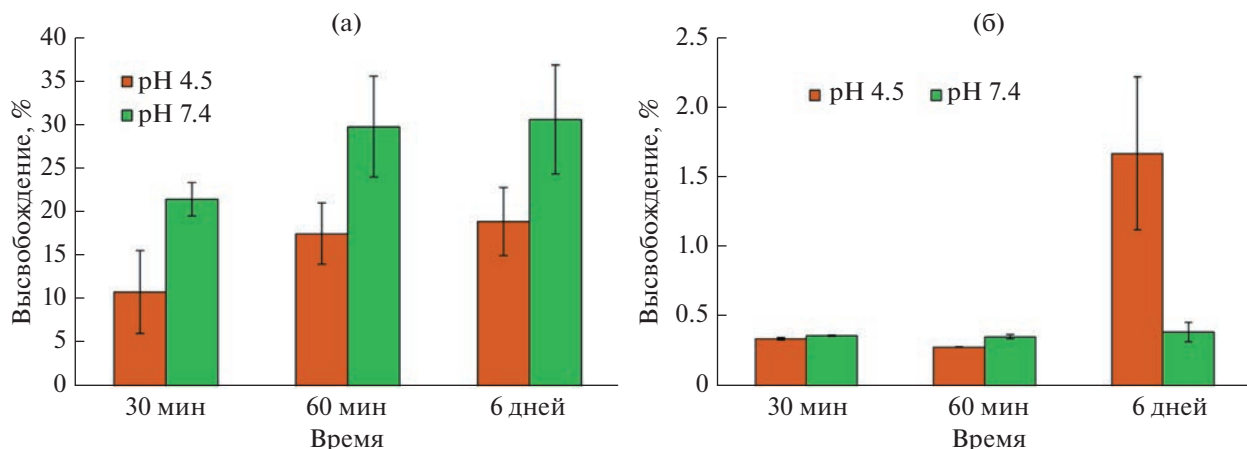


Рис. 6. Профили высвобождения модельного вещества (конъюгат BSA–TRITC) из пористых частиц кремнезема класса AMS-6 (а) и карбоната кальция (б), покрытых гидрогелевой оболочкой из альгината натрия, при различных pH внешней среды.

Ключевыми критериями для оценки сформированного полимерного pH-чувствительного покрытия являются профили высвобождения загруженного вещества во времени при различных значениях pH внешней среды. Для этого выбраны значения pH 4.5 и 7.4. Данные значения продиктованы литературными данными о нормальном физиологическом pH, в том числе в крови человека, а значение 4.5 соответствует минимальным значениям pH в фагосомах и лизосомах макрофагов и, таким образом, является контрольной точкой оценки pH-индуцированного высвобождения при воздействии организма.

В качестве контроля использованы аналогичным образом полученные профили высвобождения из соответствующих частиц без гидрогелевого покрытия (рис. 4). Было показано, что для частиц кремнезема класса AMS-6 в этом случае доля высвободившегося конъюгата BSA–TRITC в единицу времени не зависит от pH внешней среды и достигает максимума за 3 ч с выходом на плато при ~60% высвободенного вещества.

В то же время карбонат кальция подвержен распаду при пониженном pH < 5.5, в связи с этим высвобождение в кислой среде происходит быстрее, чем при pH 7.4, и протекает более суток.

Покрытие частиц кремнезема гидрогелевой оболочкой приводит к замедлению процесса высвобождения модельного вещества из мезопористых частиц кремнезема за счет дополнительной диффузии молекул BSA–TRITC через гель. Высвобождение при pH 7.4 показало замедленную кинетику высвобождения на 30% при времени высвобождения в 1 ч в сравнении с контрольным образцом без гидрогелевого покрытия (рис. 4 и ба). При pH 4.5 наблюдается снижение доли высвободившегося конъюгата BSA–TRITC в единицу времени с выходом на насыщение при высво-

бождении BSA–TRITC в 20%. В отличие от контрольного образца частиц кремнезема, не покрытых гидрогелевым покрытием, профиль высвобождения в этом случае нелинейный и имеет тенденцию к выходу на насыщение. Это вызвано, прежде всего, способностью альгината к уплотнению в условиях пониженного pH, как показано, например, в работах [35, 36].

Интересно, что на коротких промежутках времени аналогичный эффект наблюдается и для частиц карбоната кальция, покрытых гидрогелевой оболочкой (рис. 6б), демонстрируя снижение процента высвободенного в субфазу BSA–TRITC, по сравнению с образцом при pH 7.4. Общий процент высвободенного конъюгата BSA–TRITC из частиц карбоната кальция, покрытых альгинатной оболочкой, при pH 7.4 составил менее 1% за час с тенденцией к повышенному высвобождению при pH 7.4. Небольшой процент высвобождения конъюгата BSA–TRITC, по всей видимости, связан с образованием более плотной оболочки альгината натрия в связи с большим количеством ионов Ca²⁺, приводящих к сшиванию альгинатных цепей. Однако при долгосрочной экспозиции частиц карбоната кальция с гидрогелевыми оболочками наблюдается обратный эффект с повышением процента высвободенного BSA–TRITC относительно образца, полученного при нейтральном pH среды. Это указывает на процесс распада частиц карбоната кальция под действием кислотной среды, однако значительно замедленный за счет присутствия оболочки из альгината натрия. В свою очередь, протекание процесса растворения частиц карбоната кальция также косвенно характеризует полученные альгинатные оболочки, так как отражает процесс массообмена между водной фазой с пониженным pH и растворяемой частицей через полученную оболочку.

Полученные зависимости показывают возможность использования оболочки из альгината натрия для снижения спонтанной десорбции инкапсулированных в мезопористые частицы веществ при pH ниже 5, что важно для замедления высвобождения терапевтических соединений при попадании частиц в мононуклеарную фагоцитарную систему и, соответственно, снижения токсикологического шока на печень, селезенку и другие органы, при сохранении способности высвободить загруженные соединения в условиях нормального физиологического уровня pH. Кроме того, полученные частицы имеют перспективы применения в качестве лекарственного носителя в пероральной доставке благодаря возможности снижения доли высвобожденного вещества в условиях сильно пониженной кислотности желудка (pH < 1.2) и двенадцатиперстной кишки (pH ~ 5.5) с постепенным повышением в тонкой (pH 6–7) и толстой (pH ~ 7) кишках, где высвобождение лекарственного препарата будет приводить к его интенсивному всасыванию в организм [37, 38].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработан подход к формированию структур ядро–оболочка на основе гидрогелевых оболочек из альгината натрия, демонстрирующих pH-зависимые свойства, на поверхности мезопористых частиц карбоната кальция и кремнезема класса AMS-6. В ходе работы была исследована грузочная способность полученных частиц, а также исследована кинетика высвобождения модельного вещества, конъюгата BSA–TRITC. Полученные профили высвобождения из ядер различной природы показали pH-зависимый режим поведения с более интенсивным высвобождением при физиологическом уровне pH 7.4 и пониженным высвобождением при пониженном pH 4.5. Общее высвобождение модельного вещества из частиц кремнезема, покрытых альгинатной оболочкой, составило 31% за 3 ч при pH 7.4 со снижением уровня высвобождения до 19% при pH 4.5. В свою очередь, десорбция BSA–TRITC из частиц карбоната кальция протекает медленнее, демонстрируя 0.4% высвобождения за 1 ч, однако также со снижением при пониженном уровне pH внешней среды. Полученные зависимости показывают возможность использования оболочки из альгината натрия для снижения спонтанной десорбции инкапсулированных в мезопористые частицы веществ при pH ниже 5, что важно для замедления высвобождения при интернализации частиц и, соответственно, снижения токсического шока от их применения, при сохранении способности высвобождать загруженные соединения в условиях нормального физиологического уровня pH. Другой возможной областью применения полученных частиц является пероральная доставка

лекарств, благодаря их возможности снизить долю высвобожденного вещества в среде желудка с низким значением pH (1–1.2).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 22-73-10032, <https://rscf.ru/project/22-73-10032/>

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chowdhury N.K., Deepika, Choudhury R., Sonawane G.A., Mavinamar S., Lyu X., Pandey R.P., Chang C.-M. Nanoparticles as an effective drug delivery system in COVID-19 // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021. V. 143. P. 112162. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112162>
2. Maleki Dizaj S., Sharifi S., Ahmadian E., Eftekhari A., Adibkia K., Lotfipour F. An update on calcium carbonate nanoparticles as cancer drug/gene delivery system // *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2019. V. 16. № 4. P. 331–345. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1587408>
3. Wani S.U.D., Ali M., Masoodi M.H., Khan N.A., Zargar M.I., Hassan R., Mir S.A., Gautam S.P., Gangadharappa H.V., M. Osmani R.A. A review on nanoparticles categorization, characterization and applications in drug delivery systems // *Vibrational Spectroscopy*. 2022. V. 121. P. 103407. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2022.103407>
4. Ghosh S., Jayaram P., Kabekkodu S.P., Satyamoorthy K. Targeted drug delivery in cervical cancer: Current perspectives // *European Journal of Pharmacology*. 2022. V. 917. P. 174751. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174751>
5. Liu R., Luo C., Pang Z., Zhang J., Ruan S., Wu M., Wang L., Sun T., Li N., Han L., Shi J., Huang Y., Guo W., Peng S., Zhou W., Gao H. Advances of nanoparticles as drug delivery systems for disease diagnosis and treatment // *Chinese Chemical Letters*. 2023. V. 34. № 2. P. 107518. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2022.05.032>
6. Yawalkar A.N., Pawar M.A., Vavia P.R. Microspheres for targeted drug delivery – A review on recent applications // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2022. V. 75. P. 103659. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103659>
7. Shah A., Aftab S., Nisar J., Ashiq M.N., Iftikhar F.J. Nanocarriers for targeted drug delivery // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2021. V. 62. P. 102426. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102426>
8. Pushpalatha R., Selvamuthukumar S., Kilimozhi D. Nanocarrier mediated combination drug delivery for chemotherapy – A review // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2017. V. 39. P. 362–371. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.04.019>
9. Croissant J.G., Fatieiev Y., Khashab N.M. Degradability and clearance of silicon, organosilica, silsesquioxane, silica mixed oxide, and mesoporous silica nanoparticles //

- Advanced Materials. 2017. V. 29. № 9. P. 1604634. <https://doi.org/10.1002/adma.201604634>
10. Trofimov A., Ivanova A., Zyuzin M., Timin A. 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. P. 167. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040167>
 11. Wilhelm S., Tavares A.J., Dai Q., Ohta S., Audet J., Dvorak H.F., Chan W.C.W. Analysis of nanoparticle delivery to tumours // *Nature Reviews Materials*. 2016. V. 1. № 5. P. 16014. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.14>
 12. Nandwana V., De M., Chu S., Jaiswal M., Rotz M., Meade T.J., Dravid V.P. Theranostic magnetic nanostructures (MNS) for cancer. In: Mirkin C., Meade T., Petrosko S., Stegh A. (Eds). *Nanotechnology-Based Precision Tools for the Detection and Treatment of Cancer*. Cancer Treatment and Research, vol 166. Springer, Cham, 2015. P. 51–83. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16555-4_3
 13. Kolar S., Jurić S., Marijan M., Vlahoviček-Kahlina K., Vinceković M. Applicability of alginate-based composite microspheres loaded with aqueous extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves in food and pharmaceutical products // *Food Bioscience*. 2022. V. 50. P. 101970. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101970>
 14. Yang M., Abdalkarim S.Y.H., Yu H.-Y., Asad R.A.M., Ge D., Zhou Y. Thermo-sensitive composite microspheres incorporating cellulose nanocrystals for regulated drug release kinetics // *Carbohydrate Polymers*. 2023. V. 301. P. 120350. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120350>
 15. Bil M., Mrówka P., Kołbuk D., Świążkowski W. Multifunctional composite combining chitosan microspheres for drug delivery embedded in shape memory polyester-urethane matrix // *Composites Science and Technology*. 2021. V. 201. P. 108481. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2020.108481>
 16. Ojagh S.M.A., Vahabzadeh F., Karimi A. Synthesis and characterization of bacterial cellulose-based composites for drug delivery // *Carbohydrate Polymers*. 2021. V. 273. P. 118587. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118587>
 17. Reza Soltani E., Ahmad Panahi H., Moniri E., Torabi Fard N., Raeisi I., Beik J., Yousefi Siavoshani A. Construction of a pH/temperature dual-responsive drug delivery platform based on exfoliated MoS₂ nanosheets for effective delivery of doxorubicin: Parametric optimization via central composite design // *Materials Chemistry and Physics*. 2023. V. 295. P. 127159. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2022.127159>
 18. Lengert E.V., Koltsov S.I., Li J., Ermakov A.V., Parakhonskiy B.V., Skorb E.V., Skirtach A.G. Nanoparticles in polyelectrolyte multilayer layer-by-layer (LbL) films and capsules—key enabling components of hybrid coatings // *Coatings*. 2020. V. 10. № 11. P. 1131. <https://doi.org/10.3390/coatings10111131>
 19. Khan A.N., Ermakov A., Sukhorukov G., Hao Y. Radio frequency controlled wireless drug delivery devices // *Applied Physics Reviews*. 2019. V. 6. № 4. P. 041301. <https://doi.org/10.1063/1.5099128>
 20. Alsehli M. Polymeric nanocarriers as stimuli-responsive systems for targeted tumor (cancer) therapy: Recent advances in drug delivery // *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2020. V. 28. № 3. P. 255–265. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.01.004>
 21. Abdella S., Abid F., Youssef S.H., Kim S., Afinjuomo F., Malinga C., Song Y., Garg S. pH and its applications in targeted drug delivery // *Drug Discovery Today*. 2023. V. 28. № 1. P. 103414. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.103414>
 22. Tang H., Zhao W., Yu J., Li Y., Zhao C. Recent development of pH-responsive polymers for cancer nanomedicine // *Molecules*. 2018. V. 24. № 1. P. 4. <https://doi.org/10.3390/molecules24010004>
 23. Kolawole O.M., Cook M.T. *In situ* gelling drug delivery systems for topical drug delivery // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2023. V. 184. P. 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2023.01.007>
 24. Al Ragib A., Chakma R., Dewan K., Islam T., Kormoker T., Idris A.M. Current advanced drug delivery systems: Challenges and potentialities // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2022. V. 76. P. 103727. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103727>
 25. Shaikh M.A.J., Gupta G., Afzal O., Gupta M.M., Goyal A., Altamimi A.S.A., Alzarea S.I., Almalki W.H., Kazmi I., Negi P., Singh S.K., Dua K. Sodium alginate-based drug delivery for diabetes management: A review // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023. V. 236. P. 123986. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123986>
 26. Hegde V., Uthappa U.T., Altalhi T., Jung H.-Y., Han S.S., Kurkuri M.D. Alginate based polymeric systems for drug delivery, antibacterial/microbial, and wound dressing applications // *Materials Today Communications*. 2022. V. 33. P. 104813. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.104813>
 27. Karim A., Rehman A., Feng J., Noreen A., Assadpour E., Kharazmi M.S., Lianfu Z., Jafari S.M. Alginate-based nanocarriers for the delivery and controlled-release of bioactive compounds // *Advances in Colloid and Interface Science*. 2022. V. 307. P. 102744. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102744>
 28. Kianersi S., Solouk A., Saber-Samandari S., Keshel S.H., Pasbakhsh P. Alginate nanoparticles as ocular drug delivery carriers // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2021. V. 66. P. 102889. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102889>
 29. López-Menchero J.R., Ogawa M., Mauricio J.C., Moreno J., Moreno-García J. Effect of calcium alginate coating on the cell retention and fermentation of a fungus-yeast immobilization system // *LWT*. 2021. V. 144. P. 111250. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111250>
 30. Gao C., Qiu H., Zeng W., Sakamoto Y., Terasaki O., Sakamoto K., Chen Q., Che S. Formation mechanism of anionic surfactant-templated mesoporous silica // *Chemistry of Materials*. 2006. V. 18. № 16. P. 3904–3914. <https://doi.org/10.1021/cm061107+>
 31. Atluri R., Hedin N., Garcia-Bennett A.E. Hydrothermal phase transformation of bicontinuous cubic mesoporous material AMS-6 // *Chemistry of Materials*.

2008. V. 20. № 12. P. 3857–3866.
<https://doi.org/10.1021/cm702440n>
32. *Sergeeva A., Sergeev R., Lengert E., Zakharevich A., Parakhonskiy B., Gorin D., Sergeev S., Volodkin D.* Composite magnetite and protein containing CaCO₃ crystals. External manipulation and vaterite → calcite recrystallization-mediated release performance // *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2015. V. 7. № 38. P. 21315–21325.
<https://doi.org/10.1021/acsami.5b05848>
33. *Garcia-Bennett A.E., Kupferschmidt N., Sakamoto Y., Che S., Terasaki O.* Synthesis of mesocage structures by kinetic control of self-assembly in anionic surfactants // *Angewandte Chemie International Edition*. 2005. V. 44. № 33. P. 5317–5322.
<https://doi.org/10.1002/anie.200500113>
34. *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 // *Scientific Reports*. 2018. V. 8. № 1. P. 17763.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-35846-x>
35. *Rezk A.I., Obiweluozor F.O., Choukrani G., Park C.H., Kim C.S.* Drug release and kinetic models of anticancer drug (BTZ) from a pH-responsive alginate polydopamine hydrogel: Towards cancer chemotherapy // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019. V. 141. P. 388–400.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.013>
36. *Ilgın P., Özay H., Özay O.* Synthesis and characterization of pH responsive alginate based-hydrogels as oral drug delivery carrier // *Journal of Polymer Research*. 2020. V. 27. № 9. P. 251.
<https://doi.org/10.1007/s10965-020-02231-0>
37. *Coppi G., Iannucelli V., Bernabei M., Camerini R.* Alginate microparticles for enzyme peroral administration // *International Journal of Pharmaceutics*. 2002. V. 242. № 1–2. P. 263–266.
[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00171-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00171-0)
38. *Mukhopadhyay P., Maity S., Chakraborty S., Rudra R., Ghodadara H., Solanki M., Chakraborti A.S., Prajapati A.K., Kundu P.P.* Oral delivery of quercetin to diabetic animals using novel pH responsive carboxypropionylated chitosan/alginate microparticles // *RSC Advances*. 2016. V. 6. № 77. P. 73210–73221.
<https://doi.org/10.1039/C6RA12491G>