# ВЛИЯНИЕ РЕОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПОЛИМЕРОВ ОБОЛОЧКИ КАРБОНАТНО-КАЛЬЦИЕВЫХ ЯДЕР НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИИ ПЕРОРАЛЬНЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ

## © Н. Н. Сударева, В. Ю. Елоховский, Н. Н. Сапрыкина

Институт высокомолекулярных соединений РАН, 199004, г. Санкт-Петербург, 9-я линия В.О., д. 31 E-mail: nnsas@mail.ru

> Поступила в Редакцию 7 июля 2019 г. После доработки 12 февраля 2019 г. Принята к публикации 21 февраля 2020 г.

Исследованы реологические характеристики смесей полимеров, используемых в качестве многослойных полиэлектролитных оболочек на карбонатных ядрах — системах доставки лекарственных соединений. Показано, что структура оболочек определяется прежде всего первым полимерным слоем, его избыточным зарядом, концентрацией и ионным окружением. Корректность интерпретации вискозиметрических данных подтверждена данными сканирующей электронной микроскопии карбонатных ядер с полимерными оболочками, сформированными в различных условиях. Молекулярная масса полимеров влияет на профили высвобождения терапевтического белка, инкапсулированного в системы доставки, в жидкости, моделирующие желудочно-кишечные среды.

Ключевые слова: *пероральные системы доставки*; карбонатно-кальциевые ядра; полиэлектролитные оболочки; реологические характеристики

DOI: 10.31857/S0044461820060110

Системы доставки лекарственных препаратов находят все более широкое применение в медицине. Их использование предполагает увеличение стабильности инкапсулированных лекарственных средств, уменьшение их дозы и токсичности, продление воздействия на организм. Важную роль в усвоении лекарственных препаратов играет взаимодействие носителей с тканями-мишенями, которое определяется структурными, в частности, поверхностными характеристиками систем доставки. Следовательно, умение управлять поверхностными свойствами носителей и их функциональными характеристиками должно приводить к повышению эффективности использования систем доставки. Системы на базе частиц с лекарственными средствами, покрытых полиэлектролитными оболочками, обладают наибольшей вариативностью. Они позволяют включать в состав конструкции различные вещества, в том числе ингибиторы протеаз [1-3], а также изменять поверхностные характеристики систем доставки. Впервые подобные структуры, состоящие из полиэлектролитных слоев, были сформированы на микрометровых

меламин-формальдегидных частицах методом последовательного нанесения слоев полиэлектролитов с избыточными зарядами разных знаков (методом полиэлектролитной сборки) [4]. Пористые карбонатные ядра — CaCO<sub>3</sub> предложены в качестве «жертвенных» матриц еще в 2004 г. [5]. Их с успехом используют для доставки лекарственных средств до сих пор [2, 6–8]. Пористые ватериты — одна из полиморфных модификаций CaCO<sub>3</sub> — представляют собой сферические композиции из гексагональных кристаллов с диаметром сфер от 0.05 до 5 мкм. Обычно после нанесения полиэлектролитных оболочек карбонатные ядра растворяют в кислой среде или при помощи ЭДТА, формируя системы доставки в виде капсул, содержащих лекарственные препараты.

Одна из целей использования систем доставки пролонгирование высвобождения инкапсулированного лекарственного средства. Следовательно, сохранение пористой структуры ядер должно способствовать торможению диффузии лекарственного средства в организме и увеличивать время его воздействия. Именно пористые ватериты CaCO<sub>3</sub> использованы в данной работе в качестве ядер, которые покрывают полиэлектролитными оболочками. Эти структуры предназначены для пероральной доставки лекарственных препаратов, т. е. они должны защищать инкапсулированное соединение от воздействия кислой среды желудка и высвобождать его в щелочной среде кишечника, способствуя проникновению в кровь. Для создания пероральных систем доставки на СаСО3 ядрах формировали оболочки из биосовместимых, биодеградируемых, неиммуногенных и дешевых полимеров натурального происхождения — альгината и желатина [9]. pH-Зависимый полианион альгинат давно и широко используют в качестве компонента систем пероральной доставки [10-12]. В кислой среде желудка он нерастворим, следовательно, защищает инкапсулированные препараты, а в щелочной среде кишечника набухает и постепенно растворяется, высвобождая их. Актуальные примеры использования альгината и желатина в качестве компонентов систем доставки синоменина (препарата для лечения артрита) и артемизинина (его открытие удостоено Нобелевской премии в 2015 г.) приведены в работах [13, 14]. В большинстве случаев полиэлектролитная сборка происходит согласно базовой методике [5] с использованием растворов равных концентраций полимеров близкой молекулярной массы. Возможность варьирования интенсивности полиэлектролитных взаимодействий при изменении соотношения компонентов ранее не рассматривалась.

Цель настоящей работы — исследование влияния характеристик полиэлектролитов и их взаимодействия в процессе формирования на СаСО<sub>3</sub> ядрах полиэлектролитных оболочек на структурные и функциональные свойства систем доставки лекарственных средств.

#### Экспериментальная часть

В работе использовали соли NaCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (все — ч.д.а.; Sigma-Aldrich), промышленные образцы полианиона — альгината Na (низ-

Альгинат Na высоковязкий

ковязкого медицинского назначения производства Архангельского водорослевого комбината и высоковязкого фирмы Sigma-Aldrich) и полиамфолита желатина кислотной обработки (тип A, Rousselot SAS, Франция) и щелочной обработки (тип В, ОАО Можелит, Беларусь). Их характеристики и условия определения молекулярной массы приведены в таблипе.

Гидродинамические параметры и наличие комплексообразования в растворах смесей полимеров определяли с использованием капиллярного вискозиметра и реометра. При помощи капиллярного вискозиметра Уббелоде определяли вязкость: специфическую  $\eta_{cn} = \eta_{cMecu}/\eta_{жen}$  или относительную  $\eta_{\text{отн}} = \eta_{\text{алы}} / \eta_{\text{NaCl}}$ . Вискозиметр имел следующие размеры: длина и толщина капилляра были равны 20 см и 0.2 мм соответственно, объем шарика равнялся 3 мл. Peometp Physica MCR301 (Anton Paar, Австрия) позволяет определять реологические характеристики полимерных растворов в широком диапазоне скоростей сдвига. В двойном коаксиально-цилиндрическом измерительном узле DG26.7-SN4044 реализуется скорость сдвига ( $\dot{\gamma}$ ) в диапазоне 0.001–10 000 с<sup>-1</sup>. Измерения на обоих устройствах проводили при термостатировании растворов,  $T = 20^{\circ}$ С.

Синтез пористых СаСО3 ядер проводили согласно методике [5], модифицированной в [15]. Сливали 1 М растворы Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O и интенсивно перемешивали в течение 30 с. После 15 мин созревания суспензии полученные ядра промывали и сушили согласно вышеупомянутой методике. Формирование на СаСО<sub>3</sub> ядрах многослойных полиэлектролитных оболочек проводили согласно [5], варьируя концентрации растворов полиэлектролитов (2 или 5 мг·мл<sup>-1</sup> в воде или в растворе NaCl концентрацией 0.2 или  $0.5 \text{ моль} \cdot \pi^{-1}$ ). Перемешивание суспензий CaCO<sub>3</sub> ядер в растворах полиэлектролитов сначала осуществляли в течение 1 мин в ультразвуковой ванне при частоте 35 кГц (Fritsch GMBH, Idar-Oberstein, Германия), затем 10 мин на программируемом ротаторе-миксере MultiBio RS-24 (ООО BioSan, Латвия). Промывку и

Полимер	Изоточка рІ	Характеристики использованных полимеров	
		<i>М</i> <sub>пик</sub> , кДа	условия хроматографии
Желатин А	7.7–9.0	355	Sephadex G-200, 0.15 M NaCl
Желатин В	5.0	330	Sephadex G-200, 0.15 M NaCl
Альгинат Na низковязкий		360	PolySep GFC Linear (1–10000 кДа), элюент: 0.04 М трифтор- ацетат натрия + 0.05% NaN <sub>3</sub> , V = 0.25 мл·мин <sup>-1</sup> , T = 50°C,

колонка: 7.8 × 300 мм + 7.8 × 50 мм

1300

Характеристики использованных полимеров

сушку осуществляли по указанной в [5] методике. Для получения полиэлектролитных оболочек разной структуры наносили растворы полимеров в разной последовательности и с разными концентрациями. Кроме того, использовали растворы альгината различных молекулярных масс — как низкой, так и высокой вязкости.

Наличие полимерной оболочки на CaCO<sub>3</sub> ядрах и структуру ее поверхности визуализировали с помощью сканирующей электронной микроскопии. Для получения микрофотографий использовали сканирующий электронный микроскоп Supra 55VP (Carl Zeiss, Германия). Атомный состав образцов определяли при помощи приставки для энергодисперсионной спектроскопии, используя X-Max 80 детектор (Oxford Instruments, Великобритания). Данные атомного состава усредняли по 6–8 измерениям. Среднеквадратичная погрешность 15%.

Временные профили высвобождения терапевтических белков из карбонатных ядер, покрытых тремя парами слоев альгинат Na-желатин А, определяли в средах, моделирующих состав желудка (0.1 M HCl) и кишечника (0.07 М Na-фосфатный буферный раствор, NaФБ, pH 7.9). Использовали белки: антиоксидант супероксиддисмутаза (молекулярная масса 32 кДа) и антагонист рецептора интерлейкина (молекулярная масса 15-18 кДа), оба получены из Научноисследовательского института особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург, Россия. Инкубирование систем доставки в модельной среде желудка при  $T = 37^{\circ}$ С и постоянном перемешивании длилось 2 ч, в модельной среде кишечника системы доставки находились при тех же условиях в течение 5 ч. Через 1-2 ч инкубирования пробы центрифугировали и

определяли концентрацию белка в надосадочной жидкости (спектрофотометрически с использованием калибровки в соответствующей среде).

#### Обсуждение результатов

Назначение полиэлектролитных капсул в качестве систем доставки — замедленное высвобождение инкапсулированных лекарственных веществ через поры оболочек. Структура получаемых полиэлектролитных оболочек зависит от характеристик используемых полиэлектролитов и их взаимодействия в процессе полиэлектролитной сборки и, следовательно, коррелирует с реологическими свойствами смеси полимеров.

Для оценки реологического поведения смесей полианиона — альгината Na и полиамфолитов желатина A (pI 8) или желатина B (pI 5) разного состава в водных растворах различной ионной силы выбраны две скорости сдвига  $\dot{\gamma} = 0.63$  и  $\dot{\gamma} = 630$  с<sup>-1</sup>. В ходе формирования полиэлектролитной оболочки на СаСО3 ядрах взаимодействие макромолекул происходит в условиях движения раствора одного полимера около CaCO<sub>3</sub> ядер, чья поверхность покрыта вторым полимером. Скорость сдвига определяется диаметром вращения платформы ротатора и скоростью его вращения. Она равна примерно 0.63 с<sup>-1</sup>. Параметры использованного капиллярного вискозиметра Уббелоде обеспечивают скорость сдвига, равную 630 с<sup>-1</sup>. Реометр позволяет определять вязкость растворов при обеих скоростях сдвига.

Зависимости вязкости смесей водных растворов желатина А и альгината Na, а также желатина В и альгината Na от состава смеси (доли желатина в смеси с альгинатом Na) при разных скоростях сдви-



Рис. 1. Зависимости вязкости (*a*, *б*) смесей растворов желатин А/альгинат Na (*1*) и желатин В/альгинат Na (*2*) и приведенной вязкости (η<sub>пр</sub> = η<sub>смеси</sub>/η<sub>Жел В</sub>) (*в*) смесей растворов желатин В/альгинат Na от доли желатина в смеси с альгинатом Na (Д).

Суммарная концентрация полимеров 5 мг·мл<sup>-1</sup>. Скорость сдвига (с<sup>-1</sup>): 0.63 (*a*), 630 (б, *в*). Реометр (*a*, б), капиллярный вискозиметр (*в*). Растворы в H<sub>2</sub>O (*a*−*в*, кривые *I*), растворы в NaCl (*в*) концентрацией 0.5 (*2*), 0.2 (*3*) и 1 моль·л<sup>-1</sup> (*4*). га характеризуют интенсивность взаимодействия полимеров в смесях (рис. 1). Увеличение вязкости свидетельствует об увеличении взаимодействия полимеров. Наибольшая вязкость проявляется для смеси, содержащей 75% желатина A и 25% альгината Na при скорости сдвига  $\dot{\gamma} = 0.63 \text{ c}^{-1}$ , т. е. в условиях, близких к условиям процесса формирования полиэлектролитной оболочки (рис. 1, *a*, кривая *1*). При таком же составе смеси, но при высоких скоростях сдвига наблюдаем меньшую интенсивность взаимодействия (рис. 1, *б*, кривая *1*). Желатин A, имеющий изоточку при pH 8, имеет в нейтральной среде избыточный положительный заряд, что является причиной взаимодействия его с полианионом альгинатом Na.

Желатин В в нейтральной среде не взаимодействует с молекулами альгината Na, так как имеет избыточный отрицательный заряд (pI 5). Изменение вязкости смеси при изменении ее состава происходит плавно. Профили вязкостных зависимостей для смесей растворов желатина В и альгината Na, полученных как на капиллярном вискозиметре (рис. 1, e), так и на реометре при обеих скоростях сдвига (рис. 1, a, b, кривые 2), подтверждают это наблюдение.

Обнаруженное при помощи реологических исследований взаимодействие молекул альгината Na и желатина A проявляет себя при формировании полиэлектролитных оболочек на CaCO<sub>3</sub> ядрах. В работе [16] был определен ζ-потенциал карбонатных ядер, который равен 0 при pH 8.5. В нейтральной среде ядра имеют избыточный положительный заряд, поэтому для формирования первого слоя полиэлектролитной оболочки был использован полианион альгинат Na.

При соотношении концентраций полиэлектролитов альгината Na и желатина A, равном 1/3, использованных для формирования оболочки, концентрация первого слоя (полианиона альгината Na) мала, полимер не полностью покрывает поверхность ядер. Полимер второго слоя желатин А (pI 8) при значении рН 6 имеет положительный избыточный заряд и поэтому не склонен взаимодействовать с пористой поверхностью карбонатных ядер, несущих также избыточный положительный заряд. Желатин А взаимодействует только с имеющимся на поверхности ядер альгинатом Na. В дальнейшем на поверхности формируется плотная оболочка, не проникающая в ядра. Во втором случае при соотношении концентраций альгинат Na/желатин A = 3/1 количество альгината Na у поверхности ядер больше, что позволяет молекулам полианиона полностью покрыть поверхность ядра и даже проникнуть в поры. Следовательно, заряд поверхности ядер экранирован. Желатин А, формирую-



Рис. 2. СаСО<sub>3</sub> ядра, покрытые 5 парами слоев альгинат Na/желатин A = 1/3 (*a*) и альгинат Na/желатин A = 3/1 (*б*). Водные растворы, суммарная концентрация полимеров

одные растворы, суммарная концентрация полимеров 2 мг·мл<sup>-1</sup>.

щий следующий слой поликатиона (при нейтральном значении pH), взаимодействует с альгинатом Na даже внутри пор. Описанные особенности взаимодействия полиэлектролитов на поверхности CaCO<sub>3</sub> ядер подтверждены видом полиэлектролитных оболочек карбонатных ядер на микрофотографиях (рис. 2).

Поведение смеси полиэлектролитов желатина В и альгината Na при повышении ионной силы растворов наблюдали в капиллярном вискозиметре при больших скоростях сдвига ( $\dot{\gamma} = 630 \text{ c}^{-1}$ ), сравнивая зависимости относительной вязкости смесей от состава смесей (рис. 1, *в*). Более интенсивное экранирование зарядов на молекулах полиэлектролитов при увеличении ионной силы растворов приводит к ослаблению взаимодействия молекул и, следовательно, к уменьшению вязкости смеси. Закономерность немного (в пределах погрешности) нарушается в растворах солей 0.5 и 0.2 М (рис. 1, *в*, кривые 2, 3).

При малых скоростях сдвига (реометр,  $\dot{\gamma} = 0.63 \text{ c}^{-1}$ ) в области концентрации NaCl 0.2 моль  $\cdot \pi^{-1}$  проявляются минимальные (по сравнению с растворами в воде и в 0.5 M растворе NaCl) различия вязкостных характеристик смесей желатина A и альгината Na разного состава, что следует из приведенных на рис. 3, *а* данных. В методике формирования полиэлектролитных оболочек на CaCO<sub>3</sub> ядрах, предложенной авторами [5], последовательное нанесение слоев проводят из растворов полиэлектролитов в 0.2 M NaCl. Как показывают полученные нами данные, такая ионная сила раствора обеспечивает наибольшую стабильность



Рис. 3. Зависимость вязкости смесей желатина A и альгината Na разного состава (*a*) и относительной вязкости (η<sub>отн</sub> =η<sub>альг</sub>/η<sub>NaCl</sub>) растворов альгината Na (δ) от концентрации NaCl.

а) Реометр, скорость сдвига 0.63 с<sup>-1</sup>.
Доля желатина А в смеси с альгинатом Na: 1 — 0.0, 2 — 0.25, 3 — 0.50, 4 — 0.75, 5 — 1.0.
Суммарная концентрация полимеров 2 мг·мл<sup>-1</sup>.
б) Вискозиметр, скорость сдвига 630 с<sup>-1</sup>.
Концентрация альгината Na (мг·мл<sup>-1</sup>): 1 — 5, 2 — 2.

структуры комплекса при возможных отклонениях в концентрациях растворов полиэлектролитов.

Зависимости вязкости полианиона альгината Na от концентрации NaCl (рис. 3,  $\delta$ ) свидетельствуют о естественном увеличении вязкости растворов полимеров при увеличении их концентрации. Влияние ионной силы на вязкость раствора альгината Na (при концентрации 2 мг·мл<sup>-1</sup>) менее выражено при больших скоростях сдвига (рис. 3,  $\delta$ , кривая 2), чем при малых (рис. 3, *a*, кривая 1) т. е. в условиях полиэлектролитной сборки. Здесь следует отметить, что при максимальных скоростях сдвига полиэлектролитный эффект может не наблюдаться, преобладающее влияние на вязкость оказывает формирование структур, возникающих в сдвиговом потоке.

При меньшей скорости сдвига (0.63 с<sup>-1</sup>) вязкости смесей при соотношениях полимеров желатин A/ альгинат Na = 3/1 и 1/3 в растворах 0.2 и 0.5 M NaCl (рис. 4,  $\beta$ ) близки. Структуры оболочек CaCO<sub>3</sub> ядер, состоящих из 5 пар слоев альгината Na и желатина A, нанесенных в разных концентрационных соотношениях из растворов полиэлектролитов в 0.5 M NaCl, также не демонстрируют явно выраженных морфологических различий (рис. 4, a,  $\delta$ ).

Отметим, что, как и в случае с желатином В (рис. 1, кривые 2, 3), вязкость смеси больше в случае большей концентрации соли (рис. 4, *в*, кривые 1, 2). Предложим следующее объяснение кажущегося противоречия. Один из участников взаимодействия полиамфолит белок желатин. При увеличении ионной силы окружающей среды вследствие экранирования зарядов на поверхности белка (определяющих его нативную глобулярную конформацию) молекула желатина трансформируется таким образом, что взаимодействие с молекулами альгината Na усиливается.

Как было показано выше, большую роль в формировании полиэлектролитной оболочки играет взаимодействие первых слоев полимеров, нанесенных на CaCO<sub>3</sub> ядра. Наличие соли экранирует эти взаимодействия (отталкивание желатина А от поверхности ядра, не полностью покрытого альгинатом Na при малых его концентрациях), поэтому полимерная пленка, образующаяся на ядрах из-за сильных интерполимерных взаимодействий, отсутствует.

Определение вязкости полимеров и их смесей при помощи реометра не учитывает изменение вязкости растворителя при изменении концентрации NaCl в растворах. Результаты, приведенные на рис. 3, *а* и 4, *в*, не корректировали на вязкость 0.2 и 0.5 M растворов NaCl, поскольку вязкость 1 M раствора NaCl больше вязкости воды всего на 4%. Наблюдаемый эффект изменения вязкости смесей в растворах NaCl превышает 4%.

Метод энергодисперсионной спектроскопии использовали для детектирования состава полиэлектролитных оболочек CaCO<sub>3</sub> ядер. Определен атомный состав различных участков поверхности оболочки. Сравнивали оболочки, сформированные из пяти пар слоев альгината Na и желатина A при различных соотношениях полиэлектролитов: первый вариант —



Рис. 4. СаСО<sub>3</sub> ядра, покрытые 5 парами полиэлектролитных слоев альгинат Na/желатин A = 1/3 (*a*) и альгинат Na/ желатин A = 3/1 (*б*) из растворов в 0.5 M NaCl суммарной концентрации 2 мг·мл<sup>-1</sup>, зависимость вязкости смеси растворов желатина A и альгината Na от состава смеси (Д) при концентрациях NaCl 0.2 (2) и 0.5 моль·л<sup>-1</sup> (1) при той же суммарной концентрации (*в*).

Скорость сдвига 0.63 с<sup>-1</sup>.

альгинат Na/желатин A =1/3 в воде (рис. 2, *a*); второй вариант — альгинат Na/желатин A = 3/1 в 0.5 M NaCl (рис. 4, б). В первом случае наблюдается формирование плотной оболочки, не проникающей в ядра, где концентрация внешнего слоя полипептида желатина А втрое больше, чем альгината Na, наружный слой содержит 2.5% азота. Во втором случае, когда содержание желатина втрое меньше, чем содержание альгината Na, формируется оболочка, проникающая в поры (рис. 4, б), азот на поверхности не обнаружен. Содержание азота (N) в молекуле желатина А составляет 16 ± 3%. Кроме того, спектральный анализ свидетельствует о наличии атомов Na и Cl в случае формирования оболочки из растворов полимеров в 0.5 М NaCl. Следовательно, данные энергодисперсионного анализа адекватно отражают состав синтезируемых объектов и коррелируют с условиями процесса их обработки.

На структуру поверхности полиэлектролитных оболочек существенное влияние оказывает молекулярная масса используемых полимеров. Было проведено сравнение морфологии оболочек, изготовленных из трех пар слоев альгинат–желатин. Использовали два образца альгината Na: высокой и низкой вязкости. Терапевтический белок — антиоксидант супероксиддисмутаза инкапсулирован в СаСО<sub>3</sub> ядра при соосаждении. Оболочку из трех пар слоев альгинат Na/желатин A в соотношении 1/1 при суммарной концентрации 2 мг·мл<sup>-1</sup> формировали из растворов полимеров в 0.2 M NaCl для низковязкого альгината Na и в H<sub>2</sub>O для высоковязкого полимера. Существенным является факт более глубокого проникновения низковязкого, т. е. с молекулами меньшего размера, аль-

гината Na в поры ядра. Оболочка с высоковязким альгинатом Na (молекулы большего размера) формируется на поверхности ядра. Подобное поведение полиэлектролитов различной молекулярной массы было продемонстрировано при помощи сканирующей электронной микроскопии и конфокальной микроскопии на примерах гидрохлорида полиаллиламина в паре с полистиролсульфонатом [17] или гиалуроновой кислотой [18].

Реологические характеристики смесей растворов полиэлектролитов, использованных для формирования полиэлектролитных оболочек, определяли при помощи реометра (при скорости сдвига, характерной для процесса нанесения полиэлектролитных слоев,



Рис. 5. Временные профили высвобождения супероксиддисмутазы из CaCO<sub>3</sub> ядер, покрытых тремя парами слоев альгинат Na/желатин A, в среды, имитирующие разные разделы желудочно-кишечного тракта.

Альгинат: 1 — низковязкий, 2 — высоковязкий.

 $\dot{\gamma} = 0.63 \text{ c}^{-1}$ ). Вязкость смеси желатина A и альгината Na высокой вязкости (в соотношении 1/1) в H<sub>2</sub>O при суммарной концентрации полимеров 2 мг·мл<sup>-1</sup> равна 41 мПа·с. Для низковязкого альгината Na вязкость смеси в 0.2 M NaCl при той же суммарной концентрации равна 16 мПа·с (близкое значение вязкости было получено в предыдущих экспериментах по определению влияния ионной силы раствора на реологические характеристики, рис. 4, *e*, кривая 2). Использование альгината Na различной вязкости при формировании полиэлектролитных оболочек на CaCO<sub>3</sub> ядрах играет важную роль в процессе исследования высвобождения инкапсулированного белка в растворы, имитирующие среды желудочно-кишечного тракта. Варьирование плотности и глубины проникновения полиэлектролитной оболочки в поры CaCO<sub>3</sub> ядер может контролировать скорость высвобождения инкапсулированного объекта в имитаторную



Рис. 6. Микрофотографии карбонатных ядер, покрытых тремя парами слоев альгинат Na/желатин A (1/1). Исходные ядра (*a*, *б*); после 2 ч пребывания в среде, имитирующей желудок, — 0.1 н HCl (*в*, *г*). После 24 ч пребывания в среде, имитирующей кишечник, — 0.07 М ФБ, рН 7.9 (*д*, *e*). Альгинат: *a*, *в*, *д* — низковязкий; *б*, *г*, *e* — высоковязкий.

среду. Это предположение подтверждает вид временных профилей высвобождения супероксиддисмутазы в среды, имитирующие по составу желудок и кишечник, из CaCO<sub>3</sub> в полиэлектролитных оболочках из трех пар альгината (различных молекулярных масс) и желатина A (рис. 5). В среде, имитирующей желудок, высвобождения белка не наблюдали в течение 2 ч. CaCO<sub>3</sub> ядра должны растворяться в кислой среде. Альгинат не растворяется даже в комплексе с желатином, что и служит защитой карбонатного ядра и инкапсулированного белка.

Результаты высвобождения фермента супероксиддисмутазы из систем доставки описанной выше структуры коррелируют с видом СаСО3 ядер в оболочках разного состава после пребывания в средах, имитирующих разные отделы желудочно-кишечного тракта (микрофотографии ядер представлены на рис. 6). Различия в исходных структурах оболочек, полученных с использованием альгината Na paзной молекулярной массы, причины которых были описаны выше, видны на рис. 6, а, б. После пребывания в среде, имитирующей желудок, в течение 2 ч оболочки стабильны независимо от молекулярной массы использованного альгината (как низковязкого — рис. 6, в, так и высоковязкого — рис. 6, г), что подтверждено отсутствием высвобождения белка (рис. 5). После 24 ч пребывания в среде, имитирующей кишечник, наблюдаются разрушения структуры СаСО<sub>3</sub> ядер, интенсивность которых определяется структурой полиэлектролитной оболочки (рис. 6,  $\partial$ , e). В случае использования высоковязкого альгината Na полиэлектролитная оболочка интенсивно растворяется в щелочной среде за 24 ч, благодаря своему расположению на поверхности ядер, более доступному для среды, имитирующей кишечник (рис. 6, е). Ядра экспонируются в среду, содержащую соли HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, где вступают в реакцию ионного обмена, превращаясь в ядра СаНРО4, имеющие значительно более рыхлую структуру, чем карбонатные ядра [19]. Структура ядер изменена, что позволяет инкапсулированному белку быстро высвобождаться из системы доставки (рис. 5, кривая 2). При использовании низковязкого альгината Na, частично проникшего в пористую матрицу карбонатных ядер, разрушение структур оболочек не столь драматично, наблюдается некоторое количество целых ядер (рис. 6, д), высвобождение белка заторможено (рис. 5, кривая 1).

Дополнительным подтверждением того факта, что полиэлектролитное покрытие с низковязким альгинатом Na лучше удерживает белок в ядрах, служат данные хроматографического анализа. В суммарных супернатантах, полученных в ходе формирования трехслойной оболочки из альгината Na низкой вязкости и желатина A на карбонатных ядрах с белком (антагонистом рецептора интерлейкина 1), содержится 7.2 мг·мл<sup>-1</sup> белка, тогда как высоковязкий альгинат Na в ходе формирования аналогичной оболочки позволяет выйти большему количеству белка — 9.1 мг·мл<sup>-1</sup>.

#### Выводы

Показано, что молекулярная масса полиэлектролитов и их взаимодействие влияют на структуру и функции систем доставки на базе пористых CaCO<sub>3</sub> ядер, покрытых полиэлектролитными (альгинат натрия–желатин) оболочками.

Обнаружено, что уменьшение молекулярной массы альгината натрия позволяет в процессе формирования оболочки проникать молекулам внутрь пористой среды CaCO<sub>3</sub> ядер, затрудняя в дальнейшем высвобождение инкапсулированного белка в среде желудочно-кишечного тракта. При этом реологические характеристики смесей полиэлектролитов коррелируют со структурой оболочек.

Регулирование структуры оболочек карбонатных ядер за счет использования смесей полиэлектролитов оказывает существенное влияние на функциональные характеристики систем доставки, а также может играть важную роль при реализации различных физиологических механизмов «захвата» инкапсулированного препарата.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

#### Информация об авторах

*Сударева Наталья Николаевна*, к.ф.-м.н., ORCID: https://orcid.org/0000-0002-2122-4498

*Елоховский Владимир Юрьевич*, к.т.н., ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9123-4926

*Сапрыкина Наталья Николаевна*, к.х.н., ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9240-1690

### Список литературы

[1] 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.

https://doi.org/10.1134/S0006297911030059

[Balabushevich N., Pechenkin M., Zorov I., Larionova N., Sibanova E. Mucoadhesive polyelectrolyte microparticles containing recombinant human insulin and its analogs aspart and lispro // Biochem. (Mosc). 2011. V. 76. N 3. P. 327–331. https:// doi.org/10.1134/S0006297911030059].

- [2] Shi D., Ran M., Zhang L., Huang H., Li X., Chen M., Akashi M. Fabrication of biobased polyelectrolyte capsules and their application for glucose-triggered insulin delivery // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2016. V. 8. N 22. P. 13688–13697. https://doi.org/10.1021/acsami.6b02121
- [3] Kakran M., Muratani M., Tng W. J., Liang H., Trushina D. B., Sukhorukov G. B., Ng H. H., Antipina M. N. Layered polymeric capsules inhibiting activity of RNAses for intracellular delivery of messenger RNA // J. Mater. Chem. B. 2015. V. 3. P. 5842–5848.

https://doi.org/10.1039/C5TB00615E

- [4] Sukhorukov G., Donath E., Davis S., Lichtenfeld H., Caruso F., Popov V., Möhwald H. Stepwise polyelectrolyte assembly on particle surfaces: A novel approach to colloid design // Polym. Adv. Technol. 1998. V. 9. N 10–11. P. 759–767. https://doi.org/10.1002/ (SICI)1099-1581(1998100)9:10/11<759::AID-PAT846>3.0.CO;2-Q
- [5] Volodkin D. V., Petrov A. I., Prevet M., Sukhorukov G. Matrix polyelectrolyte microcapsules: New system for macromolecule encapsulation // Langmuir. 2004. V. 20. N 8. P. 3398–3406.

https://doi.org/10.1021/la036177z

- [6] Volodkin D. CaCO<sub>3</sub> templated micro-beads and -capsules for bioapplications // Adv. Coll. Interface Sci. 2014. V. 207. P. 306–324. https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.04.001
- [7] Richardson J., Maina J., Ejima H., Hu M., Guo J., Cho M., Gunavan S., Lybaert L., Hagemeyer C., De Geest B., Caruso F. Versatile loading of diverse cargo into functional polymer capsules // Adv. Sci. 2015. V. 2. N 1–2. P. 1400007 (6 pp).

https://doi.org/10.1002/advs.201400007

- [8] Sudareva N., Suvorova O., Saprykina N., Smirnova N., Bel'tiukov P., Petunov S., Radilov A., Vilesov A. Two-level delivery systems based on CaCO<sub>3</sub> cores for oral administration of therapeutic peptides // J. Microencapsul. 2018. V. 35. N 7–8. P. 619–634. https:// doi.org/10.1080/02652048.2018.1559247
- [9] Polomska A., Leroux J.-C., Brambilla D. Layer-bylayer coating of solid drug cores: A versatile method to improve stability, control release and tune surface properties // Macromol. Biosci. 2017. V. 17. N 1. P. 16000228. https://doi.org/10.1002/mabi.201600228

- [10] Zhang Y., Wei W., Lu P., Wang L., Ma G. Preparation and evaluation of alginate–chitosan microspheres for oral delivery of insulin // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2011. V. 77. N 1. P. 11–19. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.09.016
- [11] Tu L., He Y., Yang H., Wu Z., Yi L. Preparation and characterization of alginate-gelatin microencapsulated Bacillus subtilis SL-13 by emulsification/internal gelation // J. Biomat. Sci. Polym. E. 2015 V. 26. N 12. P. 735–749.

https://doi.org/10.1080/09205063.2015.1056075

- [12] Sudareva N., Suvorova O., Saprykina N., Vilesov A., Bel'tyukov P., Petunov S. Alginate-containing systems for oral delivery of superoxide dismutase/ Comparison of various configuration and their properties // J. Microencapsul. 2016. V. 33. N 5. P. 487–496. https:// doi.org/10.1080/02652048.2016.1206146
- [13] Shi D., Greever R., Chen Y. Preparation and characterization of novel sinomenine microcapsules for oral controlled drug delivery // Drug. Dev. Ind. Pharm. 2010. V. 36. N 4. P. 482–489. https://doi.org/10.3109/03639040903262003
- [14] Chen Y., Lin X., Park H., Greever R. Study of artemisinin nanocapsules as anticancer drug delivery systems // Nanomedicine. 2009. V. 5. N 3. P. 316–322. https://doi.org/10.1016/j.nano.2008.12.005
- [15] Sudareva N., Popova H., Saprykina N., Bronnikov S. Structural optimization of calcium carbonate cores as templates for protein encapsulation // J. Microencapsul. 2014. V. 31. N 4. P. 333–343. https:// doi.org/10.3109/02652048.2013.858788
- [16] Volodkin D., Larionova N., Sukhorukov G. Protein encapsulation via porous CaCO<sub>3</sub> microparticles templating // Biomacromolecules. 2004. V. 5. N 5. P. 1962–1972. https://doi.org/10.1021/bm049669e
- [17] Petrov A., Volodkin D., Sukhorukov G. Proteincalcium carbonate co-precipitation. A tool for protein encapsulation // Biotechnol. Prog. 2005. V. 21. N 3. P. 918–925. https://doi.org/10.1021/bp0495825
- [18] Szarpak A., Pignot-Paintrand I., Nicolas C., Picart C., Auzély-Velty R. Multilayer assembly of hyaluronic acid/poly(allylamine): Control of the buildup for the production of hollow capsules // Langmuir. 2008. V. 24. N 17. P. 9767–9774.

https://doi.org/10.1021/la801274z

[19] Sudareva N. N., Saprykina N. N., Popova E. V., Vilesov A. D. Porous calcium carbonate cores as templates for preparation of peroral proteins delivery systems / Ed. A. Cohen. Calcium Carbonate: Occurrence, Characterization and Applications. New York: Nova Sci. Publ., Inc. (NOVA), 2015. P. 73–95.