

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ  
И СИСТЕМЫ ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЯ

УДК 544.77

ИССЛЕДОВАНИЕ ЧАСТИЦ ПОЛИ(D,L-ЛАКТИД-СО-ГЛИКОЛИДА)  
С ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНОЙ ОБОЛОЧКОЙ МЕТОДОМ  
ДИНАМИЧЕСКОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА

© 2022 г. М. А. Ванцянь<sup>1,\*</sup>, А. В. Бусленко<sup>1</sup>, В. В. Саруханова<sup>1</sup>, Т. В. Букреева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

\*E-mail: Vantsyan\_MA@nrcki.ru

Поступила в редакцию 17.05.2022 г.

После доработки 17.05.2022 г.

Принята к публикации 27.06.2022 г.

Методом динамического рассеяния света изучены субмикронные частицы поли(D,L-лактид-со-гликолида) с оболочками, нанесенными послойной адсорбцией синтетических и природных полиэлектролитов. Исследовано влияние нанесения полиэлектролитных слоев на средний размер частиц и их  $\zeta$ -потенциал. Сделаны выводы об оптимальном составе комплексных частиц с точки зрения их размеров для использования в живых системах и агрегативной устойчивости.

DOI: 10.56304/S2782375X22020176

## ВВЕДЕНИЕ

Субмикронные частицы сополимеров молочной и гликолевой кислот – поли(D,L-лактид-со-гликолидов) (PLGA) – являются высокоперспективными носителями лекарственных веществ благодаря биосовместимости и биоразлагаемости этого полимерного материала [1, 2]. Однако потенциал их биомедицинского применения ограничен из-за ряда недостатков, к которым, в частности, относятся сложность модификации поверхности частиц PLGA из-за отсутствия поверхностно-активных функциональных групп, а также характерное “взрывное” высвобождение содержимого (“burst release”), особенно при доставке гидрофильных биоактивных веществ [3]. В качестве простого, но эффективного способа покрытия поверхности частиц PLGA, решающего эти проблемы, было предложено использовать послойное нанесение противоположно заряженных полиэлектролитов (метод Layer-by-layer, LbL) [4].

Уникальное преимущество модификации LbL по сравнению с другими методами заключается в том, что покрытие поверхности происходит за счет электростатического притяжения, что делает этот подход применимым к широкому кругу заряженных плоских поверхностей и коллоидных частиц [5–7]. Проницаемость активных агентов через такие покрытия можно регулировать изменением состава и количества полиэлектролитных

слоев [8, 9]. Помимо контроля высвобождения инкапсулированных веществ метод LbL позволяет модифицировать химический состав поверхности и придавать носителям дополнительные свойства. Например, LbL-оболочка может стимулировать взаимодействие капсул с клеточной мембраной [10].

Было показано, что LbL-нанесение полиэлектролитов является эффективным способом формирования оболочек на частицах PLGA [11]. Такие системы “ядро–оболочка” предложено применять для доставки противоопухолевых препаратов [12–14], лечения диабета [15], стимуляции адаптивного иммунитета [16], сосудистой терапии [17, 18], тканевой инженерии [19, 20].

Для создания LbL-покрытий на частицах PLGA использовали широкий ряд синтетических и природных полимеров, например поли(стирол-сульфонат натрия) и поли(аллиламин гидрохлорид) [21], альгинат натрия [22], гиалуроновую кислоту [17, 23, 24], хитозан [22, 23], поли-L-гистидин [16], поли-L-лизин [21, 25]. Компонентами LbL-оболочек могут быть белки и нуклеиновые кислоты, предназначенные для доставки. Связывание таких молекул в многослойной структуре оболочки приводит к снижению их диффузии через слои и защищает от преждевременной деструкции [23, 26, 27].

Поверхностная модификация частиц PLGA методом LbL повышает возможности реализации

стратегии адресной доставки лекарственных веществ. Например, химическая модификация фолиевой кислотой наночастиц PLGA, покрытых полиакриловой кислотой и полиэтиленгликолем [28] или хитозаном и альгинатом [29], приводила к увеличению захвата частиц раковыми клетками печени человека HepG2. LbL-оболочку с внешним слоем из гиалуроновой кислоты использовали для специфического взаимодействия частиц PLGA с мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга человека, содержащими поверхностные CD44-рецепторы [17].

При нанесении LbL-оболочки размеры наночастиц PLGA могут существенно увеличиться за счет адсорбции полимеров в виде петель и глобул [30]. Кроме того, может происходить агрегация частиц [22]. Такие последствия могут привести к существенным ограничениям применения разрабатываемых носителей в качестве средств доставки лекарств. Для использования частиц PLGA в живых системах они должны обладать достаточной агрегативной устойчивостью и размерами не более 200–300 нм [31]. Поэтому необходимо модифицировать частицы таким образом, чтобы они имели относительно небольшой размер и высокий по модулю  $\zeta$ -потенциал, свидетельствующий об электростатической стабилизации системы.

В работе для формирования полиэлектролитной оболочки на субмикронных частицах PLGA методом LbL использовали синтетические полиэлектролиты поли(аллиламин гидрохлорид), поли(диаллилдиметиламмоний хлорид) (поликатионы), поли(стиролсульфонат натрия) (полианион), а также природные полиэлектролиты, обладающие определенной биосовместимостью и биodeградируемостью – диэтиламиноэтилдекстран (поликатион), натриевую соль сульфата декстрана, альгинат и гиалуронат натрия (полианионы). Методом динамического рассеяния света (ДРС) проведено исследование влияния нанесения полиэлектролитных слоев на средний размер частиц и их  $\zeta$ -потенциал, и сделаны выводы об оптимальном составе и условиях получения системы.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Ядром для формирования полиэлектролитной оболочки служили субмикронные частицы из синтетического сополимера поли(*D,L*-лактидо- $\alpha$ -гликолида) с молярным соотношением звеньев лактидо:гликолид = 75:25, среднемассовой молекулярной массой  $M_w = 92$  кДа, полученные по методике, описанной в [32]. Образец P01 представлял собой частицы PLGA, стабилизированные поливиниловым спиртом (PVA), массовое соот-

ношение PLGA/PVA составляло 2:1. Частицы F01 PVA не содержали.

Для формирования оболочки использовали следующие полиэлектролиты: поли(аллиламин гидрохлорид) (PAH),  $M_w = 120$ – $200$  кДа, поли(диаллилдиметиламмоний хлорид) (PDADMAC),  $M_w = 200$ – $350$  кДа, поли(стиролсульфонат натрия) (PSS),  $M_w = 75$  кДа, диэтиламиноэтилдекстран (DEAE),  $M_w = 150$  кДа, натриевую соль сульфата декстрана (DS),  $M_w = 500$  кДа, альгинат натрия (Alg),  $M_w = 300$  кДа, гиалуронат натрия (Hyal),  $M_w = 260$  кДа.

Формирование полиэлектролитной оболочки проводили по следующим методикам.

*Адсорбция синтетических поликатионов.* 0.25 мл исходной суспензии наночастиц центрифугировали при  $20000g$  в течение 30 мин, затем удаляли супернатант. К полученному осадку приливали определенный объем раствора PAH или PDADMAC известной концентрации таким образом, чтобы массовое соотношение частиц и полиэлектролита составляло примерно 1:1. В случае P01 концентрация и объем раствора PAH составляли 3.84 г/л (в 0.5 М растворе NaCl) и 0.25 мл соответственно, PDADMAC – 2.76 г/л (в 0.5 М растворе NaCl) и 0.35 мл.

Для F01 концентрация и объем раствора PAH составляли 3.84 г/л (в 0.5 М растворе NaCl) и 0.5 мл соответственно, PDADMAC – 2.76 г/л (в 0.5 М растворе NaCl) и 0.7 мл.

Для удаления несвязанного с наночастицами полиэлектролита суспензию наночастиц центрифугировали при  $20000g$  в течение 30 мин. Затем удаляли супернатант, заливали осадок дистиллированной водой, ресуспендировали ультразвуком (10 мин) и перемешивали на шейкере в течение 20–30 мин с частотой 700–800 об./мин. Данную процедуру повторяли 3 раза.

*Адсорбция синтетического полианиона.* К осадку частиц приливали определенный объем раствора PSS известной концентрации (0.4 мл, 2.84 г/л, в 0.5 М растворе NaCl) таким образом, чтобы массовое соотношение частиц и полиэлектролита составляло примерно 1:1. Все дальнейшие манипуляции осуществляли так же, как и в случае поликатиона.

Адсорбцию природных полиэлектролитов проводили аналогично подобной процедуре с PAH, PDADMAC и PSS. При этом DEAE, DS, Alg и Hyal растворяли в 0.2 М растворе NaCl; концентрации данных полиэлектролитов составляли 2.5–2.8 г/л.

Гидродинамический диаметр ( $Z_{av}$ ), индекс полидисперсности (PDI) и  $\zeta$ -потенциал частиц определяли на приборе Malvern Zetasizer ZS (Великобритания).

**Таблица 1.** Свойства исходных частиц

Образец	$Z_{av}$ , нм	PDI	$\zeta$ -потенциал, мВ	Концентрация суспензии, мг/мл
P01	145 ± 1	0.07	-26 ± 1	3.6
F01	130 ± 1	0.054	-22 ± 1	6.8

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Свойства исходных частиц P01 и F01 приведены в табл. 1. Можно заключить, что введение PVA в частицы приводит к некоторому увеличению их размеров и повышению  $\zeta$ -потенциала по абсолютной величине, что, в целом, характерно для подобных систем [33]. Поскольку все исходные частицы имели отрицательный заряд, для формирования первого полиэлектролитного слоя применяли поликатионы.

Сначала изучали частицы PLGA с оболочкой из синтетических полиэлектролитов. Результаты исследования методом ДРС показали, что модификация частиц P01 поликатионами PАН и PDADMAC вызывает небольшое увеличение их размеров на 9–14 нм (табл. 2). При этом индекс PDI практически не изменяется, т.е. система остается довольно монодисперсной. Адсорбция поликатионов приводит к изменению  $\zeta$ -потенциала на несколько десятков милливольт, и знак данной величины меняется на противоположный, что свидетельствует об успешной адсорбции и PАН, и PDADMAC. Отметим, что величина изменения  $\zeta$ -потенциала при нанесении обоих поликатионов практически одинакова, и конечное значение составляет +18...+19 мВ (табл. 2). Такое невысокое абсолютное значение, в целом, характерно для нанесения поликатионов [4, 29]. Тем не менее агрегативная устойчивость частиц не снижается, о чем свидетельствуют лишь небольшое смещение пика кривой распределения по размерам в сторону больших значений в результате на-

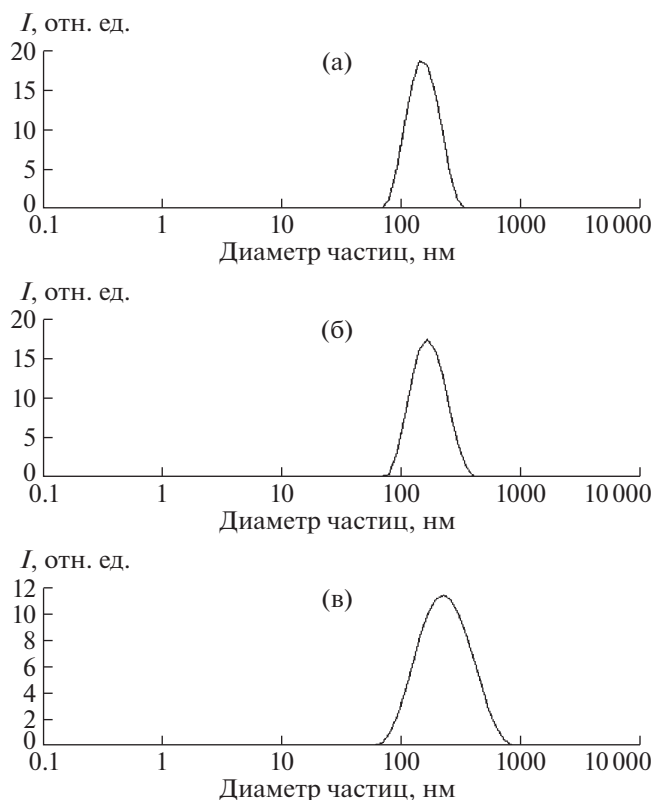
несения поликатиона (рис. 1а, 1б) и его неизменность в течение нескольких суток.

В результате последующей адсорбции полианиона PSS гидродинамический диаметр частиц увеличивается на несколько десятков нанометров (на 45 нм для PАН и 74 нм для PDADMAC), а  $\zeta$ -потенциал частиц меняет знак на противоположный, его значение составляет -36 мВ в случае PАН и -31 мВ в случае PDADMAC (табл. 2). При этом частицы становятся более полидисперсными – пик распределения по размерам уширяется (рис. 1в), индекс PDI увеличивается в 2 и 2.8 раза соответственно (табл. 2). По-видимому, несмотря на наименьшее значение  $M_w$  для PSS, его адсорбция на поверхности частиц, модифицированных поликатионами, происходит неравномерно.

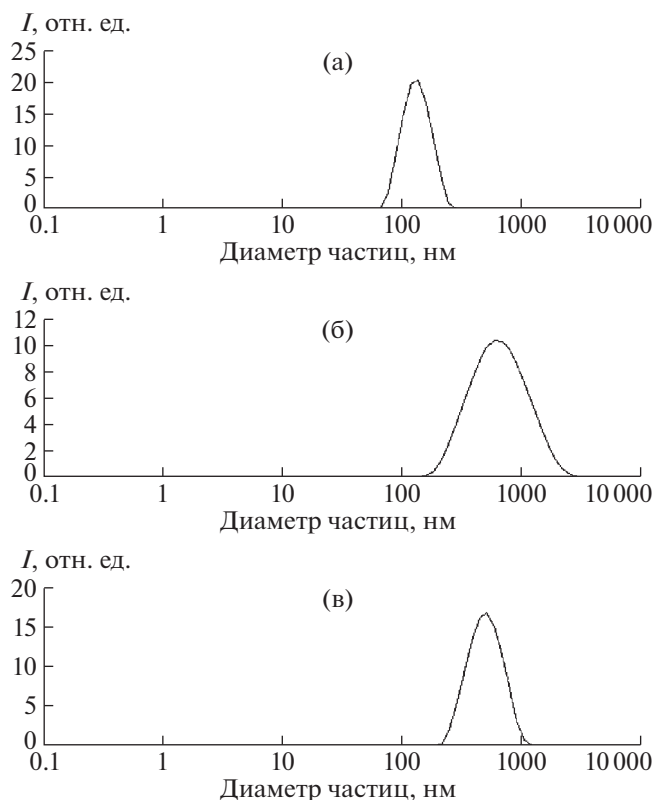
В случае образца F01 размеры модифицированных частиц в несколько раз превышают размеры исходных (рис. 2, табл. 2); вероятно, модифицированные частицы обладают невысокой агрегативной устойчивостью. Кроме того, на наличие агрегатов указывает достаточно широкий пик на кривой распределения частиц по размерам (рис. 2б). Тем не менее в случае F01–PАН наблюдается наибольшее значение  $\zeta$ -потенциала, что может указывать на высокую агрегативную стабильность модифицированных частиц. Такое несоответствие вызвано, вероятно, тем, что существенный вклад в рассеяние вносят крупные частицы, в то время как высокой электрофоретической подвижностью обладают мелкие. Снижение среднего размера частиц при адсорбции PSS на F01–PАН с 599 до 518 нм можно объяснить частичным разрушением агрегатов, а также конформационными перестройками макромолекул полиэлектролитов (вследствие достаточно высокой гибкости цепей PАН и PSS), что приводит к формированию более компактной полиэлектролитной оболочки. На частичное разрушение агрегатов также указывает менее широкий (по сравнению с F01–PАН) пик на графике распределения частиц по размерам (рис. 2в). Высокая

**Таблица 2.** Свойства частиц PLGA с оболочкой из синтетических полиэлектролитов в сравнении с исходными

Образец	Число слоев	$Z_{av}$ , нм	PDI	$\zeta$ -потенциал, мВ
P01	0	145 ± 1	0.07	-26 ± 1
P01–PАН	1	159 ± 1	0.09	18 ± 2
P01–PDADMAC	1	154 ± 2	0.07	19 ± 3
P01–PАН–PSS	2	204 ± 1	0.177	-36 ± 5
P01–PDADMAC–PSS	2	228 ± 5	0.196	-31 ± 6
F01	0	130 ± 1	0.054	-22 ± 1
F01–PАН	1	599 ± 7	0.222	49 ± 3
F01–PDADMAC	1	377 ± 51	0.392	-3 ± 3
F01–PАН–PSS	2	518 ± 12	0.268	-29 ± 5



**Рис. 1.** Распределение частиц по размерам для образцов P01 (а), P01–РАН (б), P01–РАН–PSS (в) (на основе данных ДРС).



**Рис. 2.** Распределение частиц по размерам для образцов F01 (а), F01–РАН (б), F01–РАН–PSS (в) (на основе данных ДРС).

склонность к агрегации отмечается и для F01–PDADMAC, при этом наиболее крупные агрегаты оседали на дне пробирки в виде хлопьев, сгустков, поэтому измерение  $\zeta$ -потенциала не показало переключения заряда поверхности частиц и дальнейшая модификация данного образца не представлялась целесообразной.

Далее в работе были рассмотрены частицы PLGA с оболочками из природных полиэлектролитов. Нанесение всех использованных полиэлектролитов вызывало изменение  $\zeta$ -потенциала частиц на несколько десятков милливольт с переменной знака на противоположный, что свиде-

тельствует об их успешной адсорбции (табл. 3). Адсорбция DEAE на частицах P01 привела к увеличению гидродинамического диаметра частиц на 82 нм (табл. 3). При этом на кривой распределения по размерам частиц P01–DEAE (рис. 3б) наблюдается существенное уширение пика по сравнению с исходным для P01 (рис. 3а), что, по видимому, соответствует образованию агрегатов, состоящих из нескольких частиц.

Нанесение полианионов DS, Alg и Hyal на частицы P01–DEAE увеличило их средний размер на 163, 91 и 168 нм соответственно. PDI при нанесении DS снизился в 2 раза, в случае Alg практи-

**Таблица 3.** Свойства наночастиц с оболочкой из природных полиэлектролитов в сравнении с исходными

Образец	Число слоев	$Z_{av}$ , нм	PDI	$\zeta$ -потенциал, мВ
P01	0	145 ± 1	0.07	-26 ± 1
P01–DEAE	1	227 ± 6	0.22	25 ± 1
P01–DEAE–DS	2	390 ± 5	0.11	-47 ± 3
P01–DEAE–Alg	2	318 ± 4	0.27	-21 ± 5
P01–DEAE–Hyal	2	395 ± 6	0.38	-10 ± 2
F01	0	130 ± 1	0.054	-22 ± 1
F01–DEAE	1	431 ± 84	0.50	31 ± 2

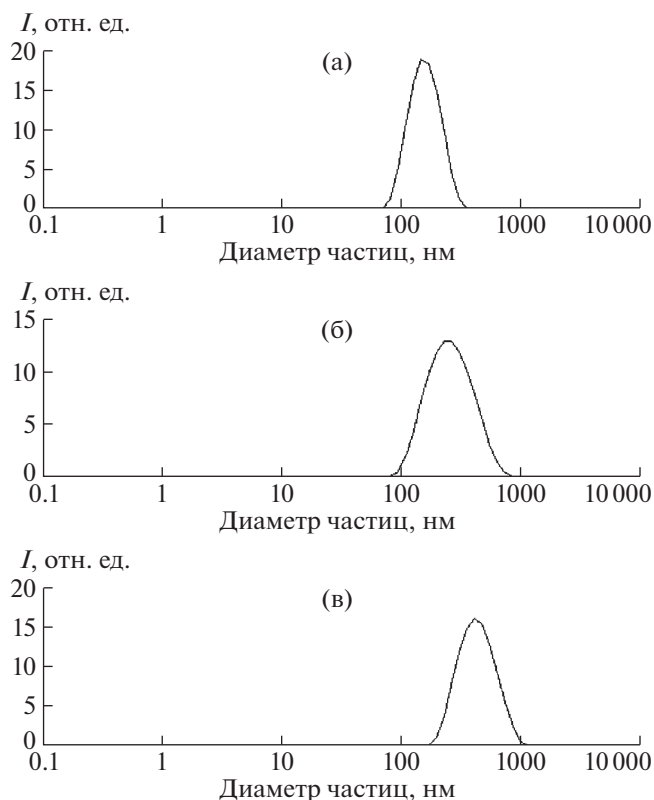


Рис. 3. Распределение частиц по размерам для образцов P01 (а), P01–DEAE (б), P01–DEAE–DS (в) (на основе данных ДРС).

чески не изменился, а для Hyal увеличился в 1.7 раза (табл. 3). При этом изменение PDI хорошо согласуется с изменением  $\zeta$ -потенциала частиц: наибольшее абсолютное значение наблюдается для DS ( $-47 \pm 3$  мВ), наименьшее – для Hyal ( $-10 \pm 2$ ). Более узкий пик на графике распределения частиц P01–DEAE–DS по размерам (рис. 3в) по сравнению с пиком для частиц P01–DEAE (рис. 3б) может соответствовать частично разрушению агрегатов при увеличении размера за счет формирования рыхлой полиэлектролитной оболочки. Большая склонность к агрегации частиц P01–DEAE–Alg и P01–DEAE–Hyal по сравнению с частицами, модифицированными синтетическими полиэлектролитами, обусловлена наличием в используемых полисахаридах большего (по сравнению с PАН, PDADMAC и PSS) числа функциональных групп (гидроксильных и карбоксильных), способствующих межмолекулярному водородному связыванию [34].

При взаимодействии F01 с DEAE происходит образование крупных агрегатов, которые, так же как и в случае F01–PDADMAC, оседали в виде хлопьев. Обработка ультразвуком с последующим перемешиванием не приводит к разрушению агрегатов: по данным ДРС размеры F01–DEAE в

несколько раз превышают размеры исходных частиц (табл. 3). Таким образом, дальнейшее формирование слоя полианиона на частицах F01–DEAE не представляется целесообразным.

Сила полиэлектролитов (как синтетических, так и природных) [35] не оказывает существенного влияния на размеры модифицированных частиц. Так, использование как слабого PАН, так и сильных PDADMAC и PSS приводит к образованию относительно компактных оболочек (табл. 2), в то время как рыхлые структуры наблюдаются и для сильного DS, и для слабых DEAE, Alg и Hyal (табл. 3). Вероятно, строение оболочек в большей степени зависит от таких факторов, как химическая природа, гибкость цепи, наличие дополнительных функциональных групп в полимере.

## ВЫВОДЫ

На поверхность субмикронных частиц PLGA за счет послыной адсорбции могут быть успешно нанесены как синтетические, так и природные полиэлектролиты. Частицы на основе PLGA, содержащие PVA, проявляют меньшую склонность к агрегации, при этом наименьшими размерами и относительно высоким по модулю  $\zeta$ -потенциалом обладают частицы с LbL-оболочкой из PАН–PSS и PDADMAC–PSS. В качестве наиболее перспективной системы для медико-биологического использования можно рекомендовать частицы PLGA/PVA с оболочкой DEAE–DS, средний диаметр которых составил 390 нм при PDI 0.11.

В дальнейшем планируется получение частиц PLGA с большим числом полиэлектролитных слоев, а также включение модельных соединений в ядро и/или оболочку.

Исследование выполнено при финансовой поддержке НИЦ “Курчатовский институт”, (приказ № 2755 от 28.10.2021 г.).

В работе использовано оборудование Ресурсного центра оптической микроскопии и спектроскопии НИЦ “Курчатовский институт”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Danhier F., Ansorena E., Silva J.M. et al.* // J. Controlled Release. 2012. V. 161. № 2. P. 505.
2. *Седуш Н.Г., Кадина Ю.А., Разуваева Е.В. и др.* // Российские нанотехнологии. 2021. Т. 16. № 4. С. 462. <https://doi.org/10.1134/S1992722321040117>
3. *Kakade S., Manickam D.S., Handa H. et al.* // Int. J. Pharm. 2009. V. 365. P. 44.
4. *Luo R., Neu B., Venkatraman S.S.* // Small. 2012. V. 16. № 8. P. 2585.
5. *Decher G.* // Science. 1997. V. 277. P. 1232.
6. *Sukhorukov G.B., Donath E., Davis S. et al.* // Polym. Adv. Technol. 1998. V. 9. P. 759.

7. *Peyratout C.S., Dahne L.* // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004. V. 43. P. 3762.
8. *Berg M.C., Zhang L., Cohen R.E. et al.* // *Biomacromolecules.* 2006. V. 7. P. 357.
9. *Yu X., Pishko M.V.* // *Biomacromolecules.* 2011. V. 12. P. 3205.
10. *Mironov E.P., Borodina T.N., Yurina D.G. et al.* // *Colloids Surf. B.* 2019. V. 184. P. 110464.
11. *Букреева Т.В., Марченко И.В., Тимаева О.И.* // *Российские нанотехнологии.* 2021. Т. 16. № 4. С. 482. <https://doi.org/10.1134/S1992722321040026>
12. *Domínguez-Ríos R., Sanchez-Ramirez D.R., Ruiz-Saray K. et al.* // *Colloids Surf. B.* 2019. V. 178. P. 199.
13. *Chai F., Sun L., He X. et al.* // *Int. J. Nanomed.* 2017. V. 12. P. 1791.
14. *Loya-Castro M.F., Sanchez-Mejia M., Sanchez-Ramirez D.R. et al.* // *J. Colloid Interface Sci.* 2018. V. 518. P. 122.
15. *Wu J.Z., Williams G.R., Li H.Y. et al.* // *Drug Deliv.* 2017. V. 24. № 1. P. 1513.
16. *Ou W., Jiang L., Thapa R.K. et al.* // *Theranostics.* 2018. V. 8. № 17. P. 4574.
17. *Lee P.C., Zan B.S., Chen L.T. et al.* // *Int. J. Nanomedicine.* 2019. V. 14. P. 1533.
18. *Meng R., Li K., Chen Z. et al.* // *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 2016. V. 36. № 1. P. 14.
19. *Park J.S., Park K., Woo D.G. et al.* // *Biomacromolecules.* 2008. V. 9. № 8. P. 2162.
20. *Kong J., Wei B., Groth T. et al.* // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2018. V. 106. № 10. P. 2714.
21. *Zhao Q., Fang Zh.X., Chen M.M. et al.* // *Micro Nano Lett.* 2018. V. 13. № 6. P. 835.
22. *Wang F., Yuan J., Zhang Q. et al.* // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2018. V. 29. № 13. P. 1566.
23. *Zhang B.J., Han Z.W., Duan K. et al.* // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2018. V. 106. № 1. P. 95.
24. *Guter M., Breunig M.* // *Methods Mol. Biol.* 2019. V. 1943. P. 153.
25. *Kapadia C.H., Ioele S.A., Day E.S.* // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2020. V. 108. № 3. P. 601.
26. *Go D.P., Palmer J.A., Mitchell G.M. et al.* // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2015. V. 103. № 5. P. 1849.
27. *Zuo Q., Guo R., Hona A. et al.* // *Biomed. Mater.* 2015. V. 10. № 3. P. 35008.
28. *Zhou J., Romero G., Rojas E. et al.* // *Macromol. Chem. Phys.* 2010. V. 211. № 4. P. 404.
29. *Zhou J., Romero G., Rojas E. et al.* // *J. Colloid Interface Sci.* 2010. V. 345. № 2. P. 241.
30. *Chai F., Sun L., He X. et al.* // *Int. J. Nanomed.* 2017. V. 12. P. 1791.
31. *Gaumet M., Vargas A., Gurny R. et al.* // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008. V. 69. P. 1.
32. *Fessi H., Puisieux F., Devissaguet J.P. et al.* // *Int. J. Pharm.* 1989. V. 55. P. R1.
33. *Vandervoort J., Ludwig A.* // *Int. J. Pharm.* 2002. V. 238. P. 77.
34. *Ануфриева Е.В., Некрасова Т.Н., Браудо Е.Е. и др.* // *Высокомолекулярные соединения. А.* 1985. Т. XXVII. № 11. С. 2347.
35. *Sharma V., Sundaramurthy A.* // *Beilstein J. Nanotechnol.* 2020. V. 11. P. 508.