

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

им. М.В. Ломоносова

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра общей физики и молекулярной электроники

На правах рукописи

Марченко Ирина Валерьевна

**МОДИФИКАЦИЯ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ КАПСУЛ
НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА И МОЛЕКУЛАМИ КРАСИТЕЛЕЙ И
ПЕРЕНОС ЭНЕРГИИ ФОТОВОЗБУЖДЕНИЯ В ЭТИХ СИСТЕМАХ**

01.04.07 – физика конденсированного состояния

02.00.06 – высокомолекулярные соединения

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук

Научные руководители:

Доктор физико-математических наук, профессор Г.С. Плотников

Кандидат химических наук, доцент Т.В. Букреева

Москва 2012

Оглавление

Список сокращений	4
Введение	5
Глава 1 Обзор литературы	9
1.1 Полиэлектrolитные капсулы.....	9
1.1.1 Метод полиионной сборки	9
1.1.2 Получение полиэлектролитной оболочки на ядрах	10
1.1.3 Способы капсулирования	11
1.1.4 Свойства микрочастиц карбоната кальция	13
1.2 Включение наночастиц металлов в стенки капсул.....	15
1.2.1 Способы включения наночастиц серебра в стенки капсул	15
1.2.2 Оптические свойства металлических наночастиц	20
1.2.3 Взаимодействие капсул с наночастицами в оболочке с лазерным излучением	25
1.3 Включение молекул красителей в полиэлектролитные капсулы.....	28
1.3.1 Оптические свойства молекул красителей	29
1.3.2 Включение молекул красителей в полиэлектролитные пленки и оболочки капсул	32
1.3.3 Капсулирование флуоресцентных красителей	34
1.4 Многокомпонентные капсулы	34
1.5 Биоразложимые полиэлектролиты в составе оболочки капсул	35
1.6 Выводы из литературного обзора и постановка задачи исследования	37
Глава 2 Экспериментальная часть	39
2.1 Материалы и реактивы	39
2.2 Методики получения образцов	40

2.3	Методы исследования	49
Глава 3. Модифицированные полиэлектролитные капсулы и их разрушение		59
3.1	Синтез наночастиц серебра на микрочастицах CaCO_3 и полиэлектролитных оболочках	59
3.2	Капсулирование красителей	667
3.3	Полиэлектролитные капсулы с включенными в оболочку молекулами красителей и их разрушение под действием лазерного излучения	72
3.3.1	Капсулы с родамином 6Ж	72
3.3.2	Капсулы с флуоресцеин изотиоцианатом	76
3.3.3	Исследование зависимости размера капсул от температуры	86
3.4	Выводы о разрушении лазером капсул, содержащих молекулы красителей ..	87
3.5	Многокомпонентные микрочастицы и капсулы	88
3.5.1	Получение многокомпонентных микрочастиц и капсул	89
3.5.2	Разделение многокомпонентных частиц под действием проназы	91
3.5.3	Разрушение полипептидной оболочки под действием проназы	92
3.6	Микроконтейнеры на основе частиц карбоната кальция для доставки лоперамида	98
Основные результаты и выводы		103
Благодарности		104
Список литературы		105

Список сокращений

ПАА – Полиаллиламин гидрохлорид

ПДДА – Полидаллилдиметил аммоний (хлорид или бромид)

ПСС – Полистиролсульфонат натрия

pArg – Поли-L-аргинин гидрохлорид

pAsp – Поли-L-аспарагиновая кислота

pGlu – Поли-L-глутаминовая кислота

ФИТЦ – Флуоресцеин изотиоцианат

ТРИТЦ – Тетраметилродамин изотиоцианат

ЭДТА – Этилендиаминтетрауксусная кислота

АСМ – атомно-силовая микроскопия

ПЭМ – Просвечивающая электронная микроскопия

СЭМ – Сканирующая электронная микроскопия

Введение.

В последнее время достигнут большой прогресс в создании полимерных нано- и микрокапсул. В настоящее время микрокапсулы применяются в фармацевтической, косметической, пищевой, текстильной и сельскохозяйственной промышленности. Яркий пример применения нанотехнологий для создания новых искусственных объектов нано- и микромира – методика формирования полиэлектролитных нано- и микрокапсул. Такие капсулы, благодаря их монодисперсности при широком диапазоне вариации размеров, простоте регулирования проницаемости, легкости изменения и возможности широкого выбора материала оболочек, стали перспективным технологическим объектом. Полиэлектролитные капсулы можно использовать в качестве микроконтейнеров, а также микрореакторов. Существенной особенностью полиэлектролитных микрокапсул является послойный характер их формирования. Это дает широкие возможности для управления их физическими и химическими свойствами. В состав микрокапсул могут быть включены молекулы флуоресцентных красителей для визуализации, магнитные наночастицы для манипуляции с помощью магнитного поля, лекарство, которое должно быть доставлено в определенное место организма. Внешний слой может быть снабжен рецепторами или антителами для адресной доставки.

Для создания систем адресной доставки лекарственных препаратов необходимо осуществлять как управляемое перемещение капсул, так и дистанционное управление проницаемостью их оболочек. Существуют различные способы воздействия на оболочку капсул, которые могут привести к высвобождению материала, помещенного внутрь: физическое (лазерное излучение, СВЧ), химическое (изменение pH) и биологическое (воздействие фермента). Для обеспечения чувствительности к лазерному излучению в состав оболочки могут быть включены наночастицы металлов и молекулы красителей, которые имеют пик поглощения в видимой области спектра. Оболочка, в состав которой входят биоразложимые полиэлектролиты, может быть разрушена под действием соответствующего фермента. Недавно был предложен новый тип капсул - многокомпонентные капсулы, которые перспективны для одновременной доставки

нескольких соединений, проведения биохимических реакций, а также для сенсорных применений. Воздействие фермента может служить для контролируемого отделения частей многокомпонентной капсулы. Помимо многослойных полиэлектролитных капсул, перспективным типом носителей для доставки функциональных соединений могут быть пористые микрочастицы, покрытые полиэлектролитной оболочкой.

Цель и задачи работы

Цель исследований – модификация полиэлектролитных капсул для вскрытия их оболочек воздействием лазерного излучения и фермента, изучение структуры и свойств таких капсул.

Для достижения поставленной цели предстояло решить следующие задачи:

1. Изучить механизм образования наночастиц серебра на оболочке полиэлектролитных капсул при проведении реакции серебряного зеркала в суспензии капсул.
2. Осуществить капсулирование красителей различного типа.
3. Изучить фотосенсибилизированное разрушение капсул, модифицированных красителями, под действием лазерного излучения.
4. Исследовать разделение на составные части многокомпонентных капсул, содержащих в оболочке биоразложимые полиэлектролиты, под действием фермента.
5. Создать контейнеры доставки лекарственных веществ через обонятельную систему на основе микрочастиц карбоната кальция, покрытых полиэлектролитной оболочкой.

Научная новизна

Впервые изучено влияние полиэлектролитных слоев на формирование наночастиц серебра на поверхности микрочастиц карбоната кальция с помощью реакции серебряного зеркала. Предложен механизм образования наночастиц серебра на поверхности микрочастиц карбоната кальция и полиэлектролитных капсул при проведении реакции серебряного зеркала в суспензии этих микрообъектов.

В работе впервые использовано включение красителей родамина 6Ж и флуоресцеин изотиоцианата в оболочку полиэлектролитных капсул для обеспечения их чувствительности к лазерному излучению. Разработаны способы включения красителей в оболочку и продемонстрировано разрушение таких капсул под действием лазера. Показано различие воздействия лазера на оболочку с адсорбированным и химически связанным красителем.

Предложен новый оригинальный способ разделения многокомпонентных микрочастиц с использованием ферментативного расщепления полиэлектролитной оболочки из полипептидов и исследована зависимость скорости разрушения такой оболочки от количества полиэлектролитных слоев, концентрации фермента и состава оболочки.

Впервые показана возможность использования контейнеров на основе микрочастиц карбоната кальция для назальной доставки анестетика в центральную нервную систему.

Практическая значимость работы

Полиэлектролитные капсулы могут быть использованы в качестве микрореакторов, контейнеров и зондов. Разработка способов модификации оболочек капсул с помощью различных физико-химических подходов имеет большую практическую значимость, связанную с созданием новых химических и биомедицинских технологий. Направленные средства доставки, такие как микроконтейнеры, позволяют защитить функциональные соединения от воздействия внешней среды, обеспечить пролонгированный выход вещества. Избирательное воздействие лекарственных препаратов предотвращает развитие побочных эффектов и позволяет уменьшить дозу вводимого препарата. Полученные в работе полиэлектролитные капсулы представляют собой новые объекты с регулируемыми физико-химическими характеристиками, перспективные в качестве контейнеров доставки лекарственных веществ с дистанционным контролем за высвобождением содержимого капсул с помощью лазерного излучения.

Для биомедицинских применений полиэлектролитных капсул перспективными объектами являются многокомпонентные капсулы. Они могут

использоваться в качестве внутриклеточных зондов, в которых в разных частях капсулы находятся различные сенсоры. Воздействие фермента на оболочку, в состав которой входят биоразложимые полиэлектролиты, может быть использовано для контролируемого отделения частей многокомпонентной капсулы внутри клетки.

Помимо полиэлектролитных капсул, в качестве контейнеров для доставки функциональных соединений перспективны микрочастицы карбоната кальция, покрытые полиэлектролитной оболочкой. Такие контейнеры безопасны, дешевы и просты в получении; при этом они способны осуществить доставку лекарственных веществ в центральную нервную систему посредством интраназального введения. Предлагаемые микроконтейнеры сами не проникают в мозг, обеспечивая прохождение только молекул препарата.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Полиэлектrolитные капсулы

1.1.1 Метод полиионной сборки

Сборка молекулярно упорядоченных пленок посредством чередующейся адсорбции противоположно заряженных полиионов была предложена Г. Дехером в 1991 г. [1, 2]. Для создания молекулярной пленки на подложке используются два раствора противоположно заряженных макромолекул, например, линейных полианионов и поликатионов. Положительно заряженная подложка помещается в раствор полианионов. Они осаждаются на подложку, при этом поверхность перезаряжается и становится отрицательной. Перезарядка поверхности предотвращает дальнейшее осаждение полианиона. Происходит насыщение адсорбции и формируется молекулярный слой с толщиной порядка 1 нм. Затем подложку ополаскивают в воде и помещают в раствор положительно заряженных макромолекул. Поликатионы осаждаются, формируя связи между противоположно заряженными ионными группами, и снова перезаряжают поверхность. Таким образом формируется бислой, который может повторяться необходимое количество раз. На каждом шаге адсорбции достигается насыщение, поэтому процесс формирования каждого слоя повторяется с высокой точностью.

Большое количество полиионов, включая ДНК и полинуклеотиды, успешно использованы для сборки упорядоченных молекулярных слоев. В качестве полиионов могут использоваться такие полианионы как полистиролсульфонат (ПСС) и поливинилсульфонат (ПВС) и поликатионы: полиаллиламин (ПАА), полиэтиленимин (ПЭИ) и полидиметилдиаллиламоний (ПДДА). Поскольку в основе метода полиионной сборки лежит электростатическое связывание соседних слоев, pH растворов полиионов должно быть таким, чтобы они были заряжены. Например, ПАА и ПСС в нейтральных водных растворах при pH 6,5-7 заряжены и могут быть использованы для сборки пленок.

Величину шага роста пленок можно регулировать добавкой соли в растворы полиионов. Низкомолекулярные ионы частично нейтрализуют заряд полиионов, изменяют их конформацию и приводят к образованию большего числа петель, так

что при осаждении на подложке образуется более толстый слой полимера. При добавлении 1 М NaCl в растворы ПСС и ПАА толщина бислоя увеличивается до 3 нм [3].

1.1.2 Получение полиэлектролитной оболочки на ядрах

В конце 90-х г. метод полиионной сборки начали применять для формирования полиэлектролитной оболочки на ядрах, которые представляют собой коллоидные частицы. При этом полиэлектролитный слой равномерно покрывает поверхность ядра. В работе [4] это доказано методом конфокальной сканирующей микроскопии: при формировании оболочки из классических полиэлектролитов ПАА и ПСС с флуоресцентной меткой интенсивность флуоресценции возрастает линейно при увеличении количества нанесенных слоев.

Метод полиионной сборки для нанесения полиэлектролитных слоев на коллоидные частицы может быть осуществлен двумя способами: либо на каждом этапе добавляется количество полиэлектролита, необходимое для насыщения адсорбции, либо полиэлектролит добавляется с избытком. Во втором случае оставшиеся молекулы полимера должны быть удалены перед нанесением следующего слоя, чтобы избежать образования комплексов в растворе. Они могут быть отделены с помощью центрифугирования или фильтрации. В [5] показано, что второй способ более эффективен, т. к. первый приводит к образованию большего количества агрегатов.

Толщина полиэлектролитной оболочки из ПАА и ПСС зависит от типа ядра, на котором она сформирована. На поверхности латексных частиц по данным малоуглового нейтронного рассеяния [6] она составляет 1.6 нм, практически не зависит от кривизны поверхности и слабо зависит от числа слоев. В случае ядер из карбоната кальция толщина одного слоя, полученная из данных атомно-силовой микроскопии, составляет 8 нм [7].

Различные материалы, включая синтетические полиэлектролиты, природные полимеры, такие как полисахариды, полипептиды, полинуклеотиды и липиды могут использоваться для формирования оболочки. Ядро может быть растворено, после чего остается полая капсула. Условием формирования устойчивой капсулы

является нерастворимость комплекса, образованного полиэлектролитами. Размер получаемых микрокапсул определяется размером ядер и может лежать в интервале от нескольких десятков нанометров [8] до десятков микрометров [9, 10]

В качестве ядер могут использоваться органические и неорганические коллоидные частицы, белки, ДНК в компактной форме, биологические клетки и лекарства. Для адсорбции полииона необходимо, чтобы ядра обладали поверхностным зарядом. Первые полиэлектролитные капсулы были изготовлены с использованием меламинформальдегидных латексных частиц в качестве ядер [11,12]. Однако в последующих работах было показано, что полного растворения таких ядер не происходит и внутри капсул остается некоторое количество продукта разложения меламинформальдегидных молекул [13]. Для полистирольных ядер в качестве растворителя используется тетрагидрофуран, однако для прикладных целей использование органических растворителей нежелательно. В случае неорганических коллоидных частиц, например CaCO_3 , для разложения не требуется органических растворителей и можно не опасаться токсического действия продуктов распада. Предпочтение неорганическим или полимерным ядрам отдается в зависимости от применения полиэлектролитных капсул.

1.1.3 Способы капсулирования

Внутри капсулы могут быть помещены различные вещества: красители, лекарства, белки. Существует несколько основных способов капсулирования. Простейший метод заключается в покрытии кристаллов или агрегатов капсулируемого вещества полиэлектролитной оболочкой. Применение этого способа ограничено кругом веществ, способных формировать регулярные конгломераты определенного размера и формы, малорастворимые в условиях получения полиэлектролитного покрытия.

Согласно второму подходу, капсулируемое вещество включается в состав ядер либо за счет совместного осаждения капсулируемого вещества с материалом ядра в процессе его получения, либо за счет адсорбции капсулируемого вещества на поверхности микроядер. После формирования полиэлектролитной оболочки ядро растворяют, а необходимое соединение остается внутри оболочки благодаря либо

большому размеру капсулируемых молекул, либо взаимодействию с противоположно заряженным внутренним слоем оболочки. В то же время низкомолекулярные продукты разложения ядра могут свободно диффундировать через оболочку капсулы.

Проницаемость стенок капсул зависит от толщины и состава оболочки. Обычно полиэлектролитная оболочка капсулы непроницаема для высокомолекулярных соединений (с молярной массой > 5 кДа), в то время как молекулы красителей и неорганические ионы могут проникнуть через стенки [14, 15]. Включение липидов в состав оболочки уменьшает проницаемость капсул, что позволяет закапсулировать низкомолекулярные вещества [16]. Величина pH и ионная сила раствора, растворитель, температура и т.д. влияют на структуру комплексов полиэлектролита и, соответственно, на проницаемость капсул. Капсулы могут быть заполнены нужным веществом с помощью изменения проницаемости оболочки. При значениях pH, близких к крайним значениям диапазона стабильности, нарушается баланс зарядов внутри полиэлектролитной оболочки, что вызывает ее разбухание и увеличение проницаемости. Возможность переключения состояния оболочки капсулы между открытым и закрытым является эффективным инструментом для капсулирования и высвобождения различных веществ [17]. Органические растворители могут также способствовать увеличению проницаемости полиэлектролитной оболочки [18]. Повышение ионной силы раствора увеличивает проницаемость полиэлектролитных капсул [19]. Такой эффект может быть объяснен изменением электростатических взаимодействий полиэлектролитов и разрывом ионных связей. Выдерживание при высокой температуре приводит к уменьшению размеров капсул, это сопровождается увеличением толщины слоя и уменьшением проницаемости [20]. Предполагается, что реорганизация структуры полиэлектролитных оболочек происходит вследствие изменения числа ионных контактов в полиэлектролитном комплексе, происходящего при повышении температуры. Уплотнение оболочки приводит к изменению ее протяженности, и, как следствие, диаметра микрокапсулы.

В работе [21] был предложен способ капсулирования низкомолекулярных веществ за счет их осаждения внутри капсулы. Полые капсулы помещались в

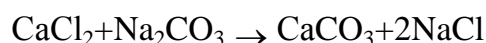
раствор красителя и затем изменяли условия таким образом, чтобы краситель стал нерастворим. Водорастворимые красители б- карбоксифлуоресцеин и родамин 6Ж осаждали изменением рН раствора; псевдоизоцианин делали нерастворимым за счет добавки противоиона; 1,7-бис(диметиламино)-гептаметин, растворимый в органических растворителях, но нерастворимый в воде, осаждали добавлением воды к раствору этого красителя в метаноле или ацетоне. Во всех случаях в результате краситель осаждался внутри капсул.

Также молекулы низкомолекулярных веществ могут быть закапсулированы, используя электростатическое взаимодействие с противоположно заряженными макромолекулами, предварительно помещенными внутрь капсулы. Например, в [22] было показано накопление молекул положительно заряженного родамина 6Ж внутри капсул (ПСС/ПАА)₅ за счет взаимодействия с отрицательно заряженным комплексом ПСС-меламин. В работе [23] капсулы, заполненные отрицательно заряженной карбоксиметилцеллюлозой, помещали в раствор положительно заряженного доксорубина, в результате чего доксорубин накапливался внутри капсулы.

1.1.4 Свойства микрочастиц карбоната кальция

Самым перспективным типом ядер для формирования полиэлектролитных капсул являются микрочастицы карбоната кальция. Эти частицы могут находиться в двух различных формах: в виде кристаллов, имеющих кубическую форму (кальцит) и сферических микрочастиц (ватерит) [24,25]. В водной среде через некоторое время (от часов до суток) ватерит полностью переходит в кальцит. Это связано с большей термодинамической стабильностью кальцита.

Обычно сферические микрочастицы карбоната кальция получают смешиванием растворов CaCl₂ и Na₂CO₃. CaCO₃ образуется в результате реакции



Аморфный осадок CaCO₃, выпадающий при быстром смешивании растворов CaCl₂ и Na₂CO₃, в результате коллоидной агрегации переходит в упорядоченные сферолиты микронного размера. Варьируя условия проведения процесса (концентрацию реагентов, температуру, интенсивность перемешивания

реакционной смеси, его продолжительность), можно получать микросферолиты со средним диаметром от 3 до 12 мкм и достаточно узким распределением по размеру. При получении таким способом частиц с размерами меньше 3 мкм и больше 12 мкм сильно увеличивается полидисперсность частиц, при этом теряется сферическая форма и возрастает доля кальцита [26,27]. Микрочастицы CaCO_3 полученные по такой методике, обладают пористой поверхностью: по данным газовой адсорбции, площадь поверхности частиц лежит в интервале 6-13 м²/г. [28]. Частицы CaCO_3 являются мезопористыми – диаметр пор лежит в диапазоне 30-90 нм, при этом поры занимают 40% объема частиц. По данным рентгеновского анализа частицы на 99% состоят из ватерита. Они имеют отрицательный поверхностный заряд, их зета-потенциал составляет -10 мВ [28].

Образование зародышей и рост сфер ватерита определяется степенью пересыщения растворенного аморфного карбоната кальция. В работе [29] были получены сферические частицы карбоната кальция субмикронного размера. При формировании частиц карбоната кальция было предложено добавлять к реакционной смеси этиленгликоль для повышения плотности раствора и снижения растворимости карбоната кальция. Это приводит к уменьшению скорости диффузии молекул, замедлению роста кристаллов и уменьшению вероятности образования зародышей. Полученные таким образом частицы имели средний диаметр 430 нм.

Биосовместимость CaCO_3 микрочастиц, их сферическая форма и возможность деградации в мягких условиях (слабокислая среда или ЭДТА) дают преимущества данным частицам для применения в качестве ядер для получения капсул. Благодаря пористой структуре микрочастицы CaCO_3 хорошо адсорбируют различные соединения. Поэтому они перспективны как в качестве ядер для формирования капсул, так и в качестве контейнеров, в которых вещество адсорбировано в порах. Кроме того, функциональное вещество может быть включено в состав CaCO_3 -микрочастиц при их формировании путем соосаждения. В [30] показана высокая эффективность капсулирования белков таким способом.

1.2 Включение наночастиц металлов в стенки капсул

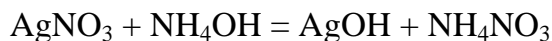
Дополнительные функциональные возможности полиэлектролитным капсулам придает включение в их стенки металлических наночастиц. Такая модификация оболочек обеспечивает проводимость при использовании капсул в электрических сенсорах, оптическое и микроволновое поглощение для температурного высвобождения содержимого капсулы, в том числе при адресной доставке лекарственных препаратов [31]. Синтез кластеров и наночастиц металлов в растворах полимеров и полимерных матрицах является одним из интенсивно развивающихся направлений получения наноструктурированных металлсодержащих систем [32].

1.2.1 Способы включения наночастиц серебра в стенки капсул

Отличительным признаком коллоидных растворов является их малая устойчивость, что объясняется их большой свободной поверхностной энергией. Способность системы наночастиц сохранять степень дисперсности обусловлена наличием у них одноименных зарядов, что мешает им соединиться в более крупные агрегаты. Появление таких зарядов связано с высокой способностью наночастиц адсорбировать из раствора низкомолекулярные ионы. Система устойчива, если возникающий при сближении зараженных частиц потенциал отталкивания превышает энергию агрегации частиц. Скорость агрегации определяется радиусом действия сил притяжения, скоростью броуновского движения, концентрацией коллоидного раствора. Наночастицы металлов для предотвращения агрегации на стадии синтеза могут быть стабилизированы заряженными органическими молекулами [33]. Стабилизированные ионами наночастицы адсорбируются на противоположно заряженный полиэлектролитный слой за счет электростатического взаимодействия. Таким образом наночастицы металлов могут быть включены в полиэлектролитную оболочку путем их адсорбции из предварительно синтезированного золя.

Наночастицы металла могут быть синтезированы и непосредственно в составе оболочки полиэлектролитных капсул за счет восстановления адсорбированных ионов. Один из эффективных способов получения в полиэлектролитной оболочке наночастиц серебра - восстановление ионов серебра в результате реакции

серебряного зеркала. При этом полиэлектролитная оболочка играет роль стабилизатора для образованных частиц. Реакция серебряного зеркала представляет собой химическое восстановление серебра при окислении ацетальдегида:



Варьирование условий реакции открывает широкие возможности управления параметрами наночастиц. В [34] описан метод получения серебряных наночастиц с достаточно узким распределением по размерам, основанный на реакции серебряного зеркала. Такие наночастицы могут существовать как в виде суспензии в воде, так и в качестве покрытий на микросферах из кварца и полистирола. По данным просвечивающей электронной микроскопии образование наночастиц включает 3 стадии: 1) образование зародышей, 2) рост и агрегация, 3) превращение агрегатов в дискретные частицы равного размера. Было показано, что рост наночастиц зависит от температуры, при которой проходит реакция: размер полученных наночастиц возрастает с повышением температуры. Это связано с тем, что при большей температуре возрастает частота столкновений между частицами.

В [35] описано превращение маленьких коллоидных частиц серебра (диаметр < 10 нм) в наночастицы различной формы в результате прохождения реакции серебряного зеркала в присутствии *n*-гексадецилтриметиламмоний бромида (ГТАБ) и при температуре 120°C. Полученные частицы имели форму кубов, треугольников, нитей и стержней. Форма и размер наночастиц зависят от концентрации поверхностно-активного вещества и реагентов, температуры и времени синтеза. Увеличение концентрации ГТАБ приводит к эволюции формы наночастиц от сферической к кубической, нитевидной и снова сферической. При возрастании концентрации $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ происходит увеличение среднего размера кубов от 55 до 72 нм, а затем появление частиц нитевидной и треугольной формы. Кубические частицы являются монодисперсными и монокристаллическими и имеют строго кубическую форму с гранями {200}. В процессе реакции вначале

образуются серебряные коллоидные частицы маленького размера, стабилизированные ГТАБ. Они нестабильны из-за большого значения поверхностной энергии и благодаря тепловому движению собираются в частицы большего размера сферической формы. Образование кубов связано с тем, что по направлениям $\{111\}$ и $\{110\}$ рост происходит быстрее, чем по $\{200\}$. Это обусловлено более сильными связями молекул ГТАБ с плоскостями кристалла серебра $\{111\}$ и $\{110\}$, чем с $\{200\}$. Также наблюдалось образование одномерных цепочек коллоидных частиц серебра с диаметром около 4 нм в мицеллах ГТАБ и формирование нанонитей, расположенных вдоль этих цепочек.

С помощью реакции серебряного зеркала была получена пленка, состоящая из наночастиц серебра на кварцевых и кремниевых подложках [36]. Для этого на подложках был предварительно образован монослой из молекул, имеющих альдегидные группы, которые служили для восстановления металлического серебра на границе подложка-жидкость. Анализ с помощью рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии подтвердил наличие на поверхности металлического серебра. Данные атомно-силовой микроскопии показали, что пленка состоит из плотно упакованных наночастиц с размером около 300 нм. Благодаря наличию пленки серебра поверхность подложки стала проводящей. В [37] описан метод нанесения пленки серебра на определенные области подложки. С помощью фотолитографии часть монослоя с альдегидными группами удалялась, и в этих местах восстановление серебра не происходило. В результате, как показали данные атомно-силовой микроскопии, на подложке была образована упорядоченная структура, состоящая из прямоугольных областей с размерами в несколько микрон.

При получении наночастиц в полимерной матрице макромолекулы не только стабилизируют дисперсные системы, но и принимают непосредственное участие в их формировании, контролируя размер и форму растущих наночастиц. В [38] проанализировано влияние степени ионизации и декарбоксилирования полиакриловой и полиметакриловой кислот различной молекулярной массы на размер и форму наночастиц, образующихся при фотохимическом восстановлении связанных в поликомплекс ионов Ag^+ . Было обнаружено, что размер и форма

наночастиц серебра, образующихся при фотовосстановлении его катионов в водных растворах поликарбоновых кислот, зависят от сродства макромолекул к ионам Ag^+ , определяющего равновесный состав исходной реакционной смеси. В присутствии полиэлектролитов, эффективно связывающих катионы Ag^+ , фотовосстановление приводит к последовательному формированию кластеров и наночастиц металла. Уменьшение относительного содержания карбоксилатных групп ниже порогового значения вызывает резкое снижение эффективности связывания, а при облучении – создает условия для агрегации сферических частиц, их фотоиндуцированной коалесценции и роста наностержней.

В качестве матрицы для образования наночастиц серебра могут быть использованы растворы биополимеров. Например, в работе [39] серебряные наночастицы были синтезированы в матрице крахмала путем последовательного добавления нитрата серебра и борогидрида натрия к водному раствору крахмала. Таким образом были получены серебряные наночастицы, имеющие кубическую структуру и средний размер 8.3 нм. Спектры поглощения раствора полученного материала содержали два четко выраженных пика поверхностного плазмонного резонанса – 380 и 420 нм. Расчеты с помощью теории Ми показали, что наличие двух пиков связано с различным диэлектрическим окружением: первый пик связан с наночастицами в водном окружении, а второй – с находящимися в окружении матрицы крахмала. Также расчеты показали, что при разбавлении раствора происходит покрытие наночастиц слоем крахмала.

Наночастицы серебра могут быть синтезированы в полиэлектролитных пленках, полученных методом полиионной сборки. В [40] была получена полиэлектролитная пленка, состоящая из ПДДА и полиакриловой кислоты. Связывания ионов серебра с карбоксильными группами полиакриловой кислоты происходит путем ионного обмена. Наночастицы были получены путем дальнейшего восстановления серебра борогидридом натрия. Образование наночастиц серебра – «зародышей» было подтверждено появлением в спектре поглощения пика при 422 нм, симметричная форма которого указывает на монодисперсность полученных частиц. Затем размер наночастиц был увеличен за счет добавления “Li Silver” - набора реагентов, которые обеспечивают рост серебряных частиц. После этого в спектре поглощения узкий пик сменился

широкой полосой поглощения. Было показано, что такая система эффективна для усиления рамановского рассеяния. В [41] было показано, что благодаря регенерации карбоксильных групп при восстановлении серебра, процесс синтеза может быть повторен циклически и таким образом увеличить объемную долю серебра в полиэлектrolитной пленке.

В [42] наночастицы серебра с размером 3-5 нм были получены в полиэлектrolитных пленках за счет фотохимического восстановления серебра под действием УФ излучения. Изучались пленки с составом ПАА/полиакриловая кислота и плизтиленимин/полиакриловая кислота. Было обнаружено, что количество связанных ионов серебра больше в случае использования в качестве поликатиона разветвленного полиэтиленимина, чем в случае ПАА. Также оно зависит от pH, при котором наносились полиэлектrolитные слои, и времени облучения.

Впервые реакцию серебряного зеркала для получения наночастиц серебра в полиэлектrolитных оболочках капсул использовали в работе [43]. Для этого ядра с определенным количеством нанесенных полимерных слоев помещали в раствор $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$ и затем приливали ацетальдегид. Положительно заряженные ионы адсорбируются на внешний отрицательно заряженный полиэлектrolитный слой и затем происходит восстановление серебра и образование наночастиц. Используя разную последовательность нанесения слоев полиэлектrolита и серебра, были получены структуры, обладающие различной стабильностью и свойствами. При восстановлении серебра на поверхности ядра после растворения ядра образуется нестабильная структура, которая распадается. Если при этом на слой серебра нанесена полиэлектrolитная матрица, то после удаления ядра металлические частицы десорбируются с внутренней стороны стенки капсулы. В оптический микроскоп наблюдалось броуновское движение наночастиц серебра, заключенных внутри капсулы. Также была получена структура, в которой слой серебра был заключен между слоями полиэлектrolитов. В [43] также представлены другие способы внедрения частиц серебра в стенки полиэлектrolитных капсул. Первый способ заключается в восстановлении серебра при участии полианилина, входящего в состав стенок капсул. Раствор нитрата серебра добавляли к суспензии

капсул и наблюдали за изменением цвета капсул. При освещении процесс восстановления серебра ускорился. Во втором методе были получены капсулы, состоящие из чередующихся слоев ПСС и ионов Ag^+ , восстановление серебра происходило под действием света. Данные просвечивающей электронной микроскопии показали, что образовались частицы серебра с размерами 10-30 нм. Ценность предложенных методов заключается в их простоте и скорости, а также в высокой стабильности полученных систем благодаря защитным свойствам полимерной матрицы.

Была показана возможность использования капсул, содержащих частицы серебра в качестве катализаторов. Изучалась реакция превращения 4-нитрофенола в 4-аминофенол в присутствии борогидрида натрия, механизм которой включает окисление Ag^0 в Ag^+ 4-нитрофенолом и восстановлении Ag^+ борогидридом натрия. За протеканием реакции наблюдали по спектру поглощения 4-нитрофенола в реакционной смеси. Было показано, что происходит полное превращение 4-нитрофенола в 4-аминофенол в присутствии капсул, содержащих серебряные частицы, в то время как в растворе серебра эта реакция практически не протекает.

1.2.2 Оптические свойства металлических наночастиц

Полиэлектролитные капсулы с включенными в оболочку металлическими наночастицами перспективны благодаря их уникальным оптическим свойствам и возможности управления этими свойствами.

Цвет золей металлических наночастиц связан с поверхностным плазмонным резонансом, с которым связана широкая полоса поглощения в видимой области на длине волны около 520 нм для золота и около 380 нм для серебра [44]. Он представляет собой коллективные колебания электронного газа на поверхности наночастиц под действием электромагнитного поля падающей световой волны. Теория поверхностного плазмонного резонанса для сферических частиц металла была создана Ми.

В квазистатическом приближении (размер частиц много меньше длины волны света)

$\omega_1 = \frac{\omega_p}{\sqrt{3}}$, где $\omega_p = (\frac{ne^2}{\epsilon_0 m_e})^{1/2}$ – плазменная частота,

ω_1 - частота поверхностного плазмонного резонанса. Смещение электронов под действием электрического поля приводит к поляризации поверхности сферы, благодаря чему возникает линейная возвращающая сила. Таким образом, свободные электроны в сферической частице представляют собой колебательную систему, в отличие от объемного материала. Существует бесконечное количество плазмонных мод различной симметрии (дипольная, квадрупольная и т. д.)



Рис. 1. Возбуждение дипольного поверхностного плазмона электрическим полем падающей волны с периодом T [44].

Оптические свойства наночастиц характеризуются сечением поглощения σ_{abs} и сечением рассеяния σ_{sca} . Сечение эстинкции $\sigma_{ext} = \sigma_{abs} + \sigma_{sca}$. Оно связано с коэффициентом эстинкции $\gamma_{ext} = N\sigma_{ext}$, где N – число наночастиц в единице объема. В квазистатическом приближении зависимость сечения эстинкции от частоты света выражается формулой Ми:

$$\sigma_{ext}(\omega) = 9 \frac{\omega}{c} \epsilon_m^{3/2} V_0 \frac{\epsilon_2(\omega)}{[\epsilon_1(\omega) + 2\epsilon_m]^2 + \epsilon_2(\omega)^2} \quad (1)$$

где $V_0 = (4\pi/3)R^3$ – объем частицы, ϵ_m – диэлектрическая проницаемость окружающего вещества, $\epsilon_1(\omega)$ и $\epsilon_2(\omega)$ – действительная и мнимая части диэлектрической проницаемости металла.

$$\varepsilon_1(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \Gamma^2}; \quad \varepsilon_2(\omega) = \frac{\omega_p^2 \Gamma}{\omega(\omega^2 + \Gamma^2)} \quad (2)$$

где $\omega_p = (ne^2 / \varepsilon_0 m_e)^{1/2}$ – плазменная частота, Γ – коэффициент затухания.

Сечение эстинкции связано с дипольным поглощением, т. к. сечение рассеяния и вклад более высоких мультипольных компонент отсутствуют в этой области размеров. Резонанс происходит на частоте, при которой выполняется условие $\varepsilon_1(\omega_1) = -2 \varepsilon_m$. При $\omega \gg \Gamma$ положение и форма резонанса могут быть определены, подставляя (2) в (1). В окрестности резонанса форма линии описывается лоренцевой кривой:

$$\sigma_{ext}(\omega) = \sigma_0 \frac{1}{(\omega - \omega_1)^2 + (\Gamma/2)^2},$$

резонансная частота $\omega_1 = \frac{\omega_p}{\sqrt{1 + \varepsilon_m}}$

Частота плазмонного резонанса зависит от размера наночастиц. Это связано с зависимостью диэлектрической проницаемости от размера $\varepsilon(\omega, R)$ – внутренним размерным эффектом, который обусловлен различными причинами: изменением атомной структуры наночастиц, влиянием поверхности частицы (повышением локализации электронов, изменением координационного числа). Коэффициент затухания Γ для объемного материала $\Gamma_\infty = \frac{v_F}{l_\infty}$, где v_F – скорость электронов, l_∞ – средняя длина свободного пробега электронов между столкновениями. Например, для Ag $l_\infty = 34$ нм при 273 К. Когда размер наночастиц меньше, чем l_∞ , эффективная длина свободного пробега становится меньше, чем в объеме, и $\Gamma(R) = \Gamma_\infty + \frac{v_F}{R}$. Тогда

$$\varepsilon(\omega, R) = \varepsilon_{os}(\omega) + \omega_p^2 \left(\frac{1}{\omega^2 + \Gamma_\infty^2} - \frac{1}{\omega^2 + \Gamma(R)^2} \right) + i \frac{\omega_p^2}{\omega} \left(\frac{\Gamma(R)}{\omega^2 + \Gamma(R)^2} - \frac{\Gamma_\infty}{\omega^2 + \Gamma_\infty^2} \right)$$

При уменьшении размера частиц происходит уширение резонансной кривой.

На оптические свойства системы влияет взаимодействие между наночастицами. Электромагнитное поле, действующее на данную частицу, складывается из внешнего поля и полей, создаваемых остальными частицами. Когда расстояние между частицами меньше, чем примерно удвоенный радиус частиц, происходит изменение спектра поглощения [44]. В [45] исследовалось влияние распределения наночастиц Au на поверхности на оптические свойства системы. Рассматривались два фактора: поверхностная плотность частиц и агрегация. Было показано, что увеличение поверхностной плотности приводит к сдвигу полосы поглощения в сторону больших длин волн. Увеличение агрегации приводит к разбиению полосы поглощения на несколько пиков.

В [46] изучалось возбуждение поверхностных плазмонов в парах одинаковых наночастиц золота. Образцы, полученные с помощью электронно-лучевой литографии, представляли собой двумерные структуры на подложке с разными расстояниями между наночастицами, диаметр которых составлял 150 нм. При уменьшении расстояния между наночастицами от 450 до 150 нм пик поверхностного плазмонного резонанса сдвигается в сторону больших длин волн от 780 до 870 нм в случае, когда поляризация света параллельна оси пары частиц, и в сторону меньших длин волн до 760 нм, когда поляризация перпендикулярна этой оси. Наблюдаемые в [45,46] эффекты объясняются диполь-дипольным взаимодействием между соседними частицами. Электрическое поле создает на поверхности наночастицы заряды, на которые действуют силы отталкивания (Рис. 2а). Когда рядом находится другая частица, благодаря поляризации, на заряды действуют дополнительные силы. Когда электрическое поле параллельно оси пары частиц (b) силы отталкивания поверхностных зарядов, и, следовательно, резонансная частота уменьшается, а в случае, если электрическое поле перпендикулярно этой оси (с), силы отталкивания возрастают.

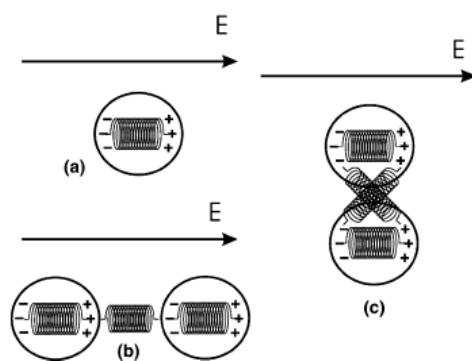


Рис 2. Электромагнитное взаимодействие между близко расположенными наночастицами: изолированная частица (a), пара наночастиц в случае, когда поляризация света параллельна оси пары частиц (b) и перпендикулярна этой оси (c).

Оптические свойства наночастиц металлов зависят от диэлектрических свойств окружающей матрицы. В [47] изучалось взаимодействие наночастиц золота, стабилизированных положительно заряженным диметиламинопиридином, с различными полиэлектролитами. Полоса плазмонного поглощения золя наночастиц уширяется и сдвигается в красную область при добавлении ПСС, ПАА и ПЭИ. Это связано с тем, что ПСС электростатически связывается с наночастицами золота, а ПАА и ПЭИ образуют слабые ковалентные связи. Добавление ПДДА к золю не влияет на полосу поглощения. Это свидетельствует о том, что этот полиэлектролит не взаимодействует с наночастицами. Наночастицы были адсорбированы на пленки ПАА/ПСС и ПДДА/ПСС. На пленки ПАА/ПСС адсорбировалось большое количество наночастиц Au, которые были равномерно распределены по поверхности, в то время как в случае ПДДА/ПСС количество адсорбированных наночастиц было меньше и они были распределены неравномерно. Таким образом, благодаря взаимодействию наночастиц Au с ПАА и ПСС могут быть получены стабильные пленки, состоящие из этих полиэлектролитов и наночастиц.

В [48] исследовались оптические свойства полиэлектролитных пленок, полученных методом полиионной сборки, содержащие наночастицы золота с размером 12 нм. Наночастицы включались в состав пленки с помощью адсорбции из золя. Были получены спектры поглощения в УФ-видимой области, содержащие

пики, связанные с индивидуальным и коллективным плазмонным резонансом. Все пленки имели пик в области 510-550 нм, соответствующий индивидуальному плазмонному резонансу, смещенный в красную область из-за диэлектрического окружения. При уменьшении расстояния между наночастицами Au в спектре возникает пик коллективного резонанса. В спектре пленки, на которую был адсорбирован монослой наночастиц Au, наблюдался пик при 620-660 нм. При увеличении поверхностной плотности частиц положение пика сдвигалось в красную область и возрастала высота пика. В случае, когда наночастицы включались в несколько слоев пленки, возникал также пик при 800 нм, соответствующий коллективному резонансу наночастиц в соседних слоях. Таким образом было показано, что приполиионной сборке нанокомпозитных пленок можно изменять расстояния между наночастицами, получая пики поглощения при разных частотах.

1.2.3 Взаимодействие капсул с наночастицами в оболочке с лазерным излучением.

Полиэлектролитные капсулы являются перспективными системами для адресной доставки лекарств. При этом необходимо обеспечить высвобождение закапсулированного лекарства в определенном месте организма, например, с помощью внешнего воздействия. Для капсул, содержащих в оболочке наночастицы металлов, таким воздействием может быть лазерное излучение, длина волны которого совпадает с пиком поглощения наночастиц. Наночастицы, находящиеся в оболочке, поглощают это излучение и преобразуют его в тепло. Из-за сильного локального нагрева оболочка капсулы разрушается, и ее содержимое высвобождается. В [49] это наблюдали для полиэлектролитных капсул с включенными наночастицами серебра и золота. Оболочки полиэлектролитных капсул были модифицированы металлическими наночастицами с помощью реакции серебряного зеркала, фотовосстановления и адсорбции из золя в оболочку. Было показано, что все предложенные способы включения наночастиц серебра и золота в оболочку обеспечивают разрушение капсул под действием зеленого лазера мощностью 100 мВт, длина волны которого (532 нм) близка пику поглощения использованных наночастиц.

При дистанционном высвобождении закапсулированного материала важно, чтобы свет взаимодействовал только с оболочкой капсулы, не разрушая при этом закапсулированный материал и ткани, окружающие капсулу. Подбирая длину волны лазера так, чтобы она не совпадала с полосами поглощения закапсулированного вещества и окружающих тканей, можно избежать их нагрева. Лазер, излучающий в близкой инфракрасной области, наиболее подходит для этой цели, так как ткани, биомедицинские препараты и вода практически не поглощают такое излучение.

В [50] изучалось разрушение ИК лазером (длина волны 830 нм) капсул, содержащих наночастицы серебра, полученные с помощью реакции серебряного зеркала. Капсулы из ПАА/ПСС не разрушаются под действием лазерного излучения, так как ПАА и ПСС не имеют полос поглощения вблизи ИК области спектра. Добавление частиц металла в оболочку капсул приводит к поглощению энергии излучения. Когда этой энергии достаточно для разрыва оболочки, происходит высвобождение закапсулированного вещества. Полоса поглощения наночастиц серебра лежит в области 380-500 нм и связана с плазмонным резонансом. Эта полоса сдвигается в красную область спектра и далее в ближнюю ИК область с увеличением размеров частиц. При мощности 25 мВт наблюдалась деформация капсул, а при мощности 70 мВт капсулы были разрушены.

В [51] было проведено дистанционное высвобождение закапсулированного материала внутри живой клетки. Полимер с флуоресцентной меткой AF-488-декстран использовался в качестве модели закапсулированного материала. Стенки капсул содержали наночастицы серебра с размером около 20 нм. Под воздействием лазерного излучения с мощностью 50 мВт AF-488-декстран покидал капсулу.

В [52] также исследовали процесс дистанционного высвобождения из полиэлектролитной капсулы закапсулированного полимера с флуоресцентной меткой с помощью лазерного излучения. Стенки капсул содержали наночастицы, состоящие из ядра AuS и оболочки Au, имеющие полосу плазмонного поглощения в области спектра, близкой к инфракрасной. В [52] рассмотрена теоретическая модель, в которой рассматривается влияние поглощения, размера и концентрации частиц на нагрев оболочки. Эта модель устанавливает связь между изменением

температуры и величиной поглощенной энергии. Изменение температуры dT после включения лазера на расстоянии r_i от центра нагрева наночастицы выражается формулой

$$\frac{dT(r_i)}{dE} = \frac{r_0^3}{r_i} \quad (3)$$

где $E=A/3K$, A – энергия, выделяющаяся в единице объема в единицу времени, K – теплопроводность окружающего вещества. Величина A пропорциональна интенсивности излучения и поглощению. При предположении, что наночастицы распределены равномерно, r_i может быть выражено через плотность наночастиц, или фактор заполнения F_s . Фактор заполнения определяется как отношение суммы всех поперечных сечений n металлических наночастиц на поверхности капсулы s_i к площади поверхности капсулы S_c

$$F_s = \frac{\sum_i^n s_i}{S_c} = \frac{nr_0^2}{4R_0^2}$$

где R_0 – радиус микрокапсулы. $F_s=1$ соответствует полному покрытию капсулы наночастицами. Температура быстро убывает с расстоянием, поэтому для небольших значений F_s достаточно учитывать вклад только ближайших соседей. Среднее расстояние между наночастицами равно

$$\langle d \rangle = r_0 \frac{2}{\sqrt{F_s}}$$

тогда (3) может быть записано следующим образом:

$$\frac{dT}{dE} \cong r_0^2 \sqrt{F_s}$$

Эта формула связывает изменение температуры с выделяющейся энергией, которая может быть измерена, и с параметрами наночастиц.

В [53] рассчитано распределение температуры в наночастицах и окружающем их материале. Для этого авторы рассматривали модель равномерно нагретой

однородной сферы, помещенной в бесконечную однородную среду. Для сферы с радиусом R , выделяющей тепло в течение времени t , можно записать уравнение теплопроводности

$$\frac{1}{k_1} \left(\frac{\partial T_1}{\partial t} \right) = \frac{1}{r^2} \left(\frac{\partial}{\partial r} \left[r^2 \left\{ \frac{\partial T_1}{\partial r} \right\} \right] \right) + \frac{A}{K_1} \quad 0 \leq r \leq R, t > 0$$

$$\frac{1}{k_1} \left(\frac{\partial T_1}{\partial t} \right) = \frac{1}{r^2} \left(\frac{\partial}{\partial r} \left[r^2 \left\{ \frac{\partial T_1}{\partial r} \right\} \right] \right) \quad r > R, t > 0$$

Граничные условия $T_1 = T_2$ при $t = 0$,

$$T_1 = T_2 \text{ и } K_1 \frac{\partial T_1}{\partial r_1} = K_2 \frac{\partial T_2}{\partial r} \text{ при } r = R$$

T_1 конечно при $r \rightarrow 0$

T_2 конечно при $r \rightarrow \infty$

Где T_1 , T_2 , K_1 , K_2 , k_1 , k_2 – температура, коэффициент теплопроводности и коэффициент диффузии частицы и среды соответственно. Было получено решение этого уравнения. Оно показывает, что для частицы золота с радиусом 30 нм при плотности потока энергии лазера 0.5 Дж/см^2 повышение температуры составляет 2500 К к концу 20 нс импульса. При этом температура окружающего вещества убывает в e раз по отношению к температуре у поверхности частицы на расстоянии порядка радиуса наночастицы. Численным моделированием было показано, что степень агрегации не влияет на среднюю температуру слоя наночастиц, однако агрегаты разогреваются под действием лазерного излучения до более высоких температур по сравнению с одиночными наночастицами.

1.3 Включение молекул красителей в полиэлектролитные капсулы

Другим способом обеспечения чувствительности капсул к лазерному излучению может быть включение в их оболочку молекул органических красителей. Внедрение в структуру капсул молекул красителя приводит к возможности фотосенсибилизированного разрушения таких структур. Облучение

квантами света в полосе поглощения внедренных молекул может приводить к их эффективному возбуждению и, при определенных условиях, к переносу энергии к оболочке капсулы, сопровождающемуся ее перестройкой и даже разрушением. Ранее эффекты фотосенсибилизированной структурной перестройки наблюдались в различных объектах: в полимерных сегнетоэлектрических пленках [54], в пленках Ленгмюра –Блоджетт на поверхности полупроводников [55].

Включение красителей в оболочку позволяет визуализировать капсулы. Кроме того, микрокапсулы с люминесцентным красителем внутри могут применяться в качестве зондов. Медицинские зонды на основе капсул с красителем, чувствительным к условиям внешней среды, позволят наблюдать состояние отдельных органов и измерять различные параметры (такие как давление, pH).

1.3.1 Оптические свойства молекул красителей.

Процессы поглощения и излучения в растворах красителей могут быть описаны путем построения схемы энергетических уровней по аналогии с простыми двухатомными молекулами. Энергия двухатомных молекул зависит от простых конфигурационных координат (межатомного расстояния). Результирующая схема энергетических уровней подобна схеме, полученной для обычного гармонического осциллятора. С другой стороны, конфигурация и, следовательно, потенциальная энергия определенного электронно-колебательно-вращательного состояния молекулы красителя есть функция многих координат. Однако для целей схематической диаграммы предполагается, что конфигурация может быть описана только одной координатой, которая изображается горизонтальным отрезком на рис. 3. Колебательно - вращательные состояния сгруппированы около электронных состояний молекулы. Типичное расстояние между различными электронными состояниями имеет порядок $10\ 000\text{--}20\ 000\ \text{см}^{-1}$; расстояние между различными колебательными состояниями, принадлежащими данному электронному состоянию, имеет порядок $1000\ \text{см}^{-1}$; расстояние между различными вращательными состояниями для данного колебательного состояния имеет порядок $1\text{--}10\ \text{см}^{-1}$. Следовательно, для данного электронного состояния колебательные и вращательные энергии проявляются как тонкая и сверхтонкая структуры соответственно. Состояния красителя, далее, группируются согласно спинам

электронов в синглетные, обозначаемые S , или триплетные, обозначаемые T . Однако в действительности обычно происходит перемешивание чистых синглетных и триплетных состояний из-за спин-орбитального взаимодействия. Оптическое поглощение является электронным процессом и происходит с гораздо большей скоростью, чем скорость, с которой молекула может изменить свою межъядерную конфигурацию; поэтому на рис. эти процессы указаны вертикальными стрелками от термически заселенных низко расположенных уровней S_0 до возбужденных уровней S_i , которые имеют те же самые конфигурационные координаты.

Поглотив свет, молекула обогащается энергией. Теперь она может излучить поглощенный фотон или с большей вероятностью безызлучательно релаксировать в низко расположенные состояния S_i , передавая энергию растворителю. Оценка времени, требуемого для релаксации, дает значения порядка 10^{-11} — 10^{-12} сек, и поэтому молекулы в состоянии S_i термализуются прежде, чем происходят другие переходы. С нижних уровней состояния S_i молекула может возвратиться в состояние S_0 , испустив фотон. Излучательная релаксация называется флуоресценцией. Энергия излученного фотона меньше энергии поглощенного фотона, флуоресценция имеет стоксов сдвиг в длинноволновую сторону относительно поглощения [56].

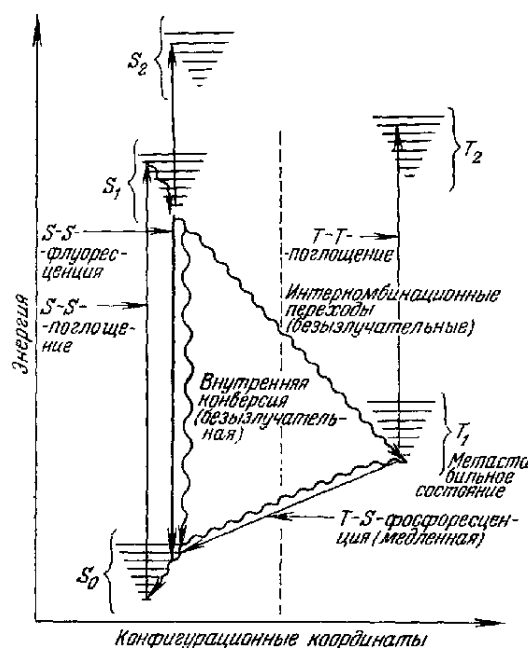


Рис. 3. Схема энергетических уровней молекулы красителя.

В конденсированных фазах: молекулярных кристаллах и твердых матрицах, за счет межмолекулярного взаимодействия и миграции энергии возбуждения как между излучающими молекулами, так и между излучающими и неизлучающими молекулами (матрица, растворитель), происходит дополнительный сдвиг в длинноволновую область полос поглощения и испускания молекул. Исследования в растворах показывают, что даже слабые Ван-дер –Ваальсовские взаимодействия приводят к красному сдвигу 10-20 нм. Более сильные сдвиги возникают при образовании ассоциатов молекул с помощью водородной связи (30-50 нм) и комплексов с переносом заряда (100 нм). Все те же причины влияют и на форму и полуширину линий поглощения и испускания. Наряду с различными механизмами уширения линий испускания индивидуальных молекул, в конденсированных фазах действует дополнительный механизм неоднородного уширения линий. Неоднородное уширение связано с вариациями спектров поглощения и флуоресценции отдельных молекул в среде. Причиной расстройки системы уровней взаимодействующих со средой молекул является влияние ближайшего окружения [57].

Колебательный перенос энергии. На расстояниях, много меньших длины волны света, осуществляется безызлучательная передача энергии электронного возбуждения при электромагнитном взаимодействии двух молекул. Такое взаимодействие может быть диполь-дипольным или обменным. Эффективность переноса энергии в таком случае зависит от степени перекрытия спектра поглощения акцептора и спектра флуоресценции донора энергии. Наряду с индуктивно-резонансным механизмом переноса энергии существует путь релаксации энергии электронного возбуждения молекул красителя в адсорбционной фазе, не требующий перекрытия электронных спектров. Это передача энергии электронного возбуждения посредством внутренней конверсии на колебательные моды и перенос колебательной энергии соседним молекулам, то есть за счет вибронных взаимодействий. В тех случаях, когда частоты наиболее интенсивных колебательных мод молекулы частично перекрываются с какой-либо вибронной полосой возбужденной молекулы красителя, краситель может эффективно передавать энергию этой молекуле [58]. Такой процесс наблюдали в системе, когда молекулы красителя родамина В были адсорбированы на

поверхности полупроводника. При появлении адсорбированных молекул воды или нафталина перенос энергии от красителя к полупроводнику резко падал. Это связано с тем, что частоты колебаний молекул воды и нафталина перекрываются с частотами колебаний молекулы родамина В и происходит колебательный перенос энергии [58].

1.3.2 Включение молекул красителей в полиэлектролитные пленки и оболочки капсул

Молекулы красителей, имеющие заряженные группы, могут быть включены в полиэлектролитные пленки за счет взаимодействия с противоположно заряженными полиэлектролитами. Например, была получена пленка чередующейся адсорбцией отрицательно заряженного красителя Конго Красного и положительно заряженного полилизина [59]. Также методом чередующейся адсорбции противоположно заряженных молекул порфиринов: положительно заряженного тетрарутений-цинк-порфирина $[ZnTPyPBpy]^{4+}$ и отрицательно заряженного мезо-тетрафенилпорфирин сульфоната $[M-TPPS]^{4-}$, была получена стабильная пленка, толщина которой линейно возрастает с количеством слоев ($12,7 \text{ \AA}$ /бислой). Электроды, модифицированные этими пленками, проявляли фотокаталитическую активность при восстановлении O_2 [60]. В [61] были получены пленки из чередующихся слоев красителя и полииона Конго Красный/ПДДА. Методом пьезоэлектрического микровзвешивания было показано, что после адсорбции как красителя, так и полииона происходит увеличение массы пленки. Вычисленная толщина слоя свидетельствует об образовании плотно упакованного мономолекулярного слоя красителя. Спектры поглощения показали, что краситель в пленке находится в виде агрегатов.

Были осуществлены различные способы модификации капсул молекулами, чувствительными к свету. Например, было показано, что освещение капсул с включенными в оболочку полимерными производными азобензола приводит к значительному изменению диаметра капсул, связанному с переходом молекулы азобензола из цис в транс конфигурацию [62, 63]. В [64] была показана возможность изменять проницаемость капсул с помощью ультрафиолетового излучения. Включение флуоресцентных красителей может также обеспечивать

чувствительность к свету. Флуоресцентные красители широко используются для визуализации различных объектов, в частности, капсул, во флуоресцентном микроскопе.

Молекулы красителей могут быть включены в оболочку после формирования капсулы [65] или быть ковалентно связанными с полиэлектролитами, составляющими оболочку [66, 67]. Были получены стабильные капсулы с включенными в оболочку красителями с чередованием заряженных молекул красителей и противоположно заряженных полиэлектролитов [67]. В этой работе образование связи между нерастворимыми в воде красителями и полиэлектролитами определялось главным образом гидрофобными и ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями: интеркаляцией и связыванием агрегатов красителя. Было обнаружено, что полученные капсулы стабильны, если краситель, находящийся в оболочке, образует агрегаты, и нестабильны в случае, когда краситель находится в виде мономеров.

В [68] в оболочку капсул из различных полиэлектролитов (ПСС, ПАА и ПДДА) был включен азокраситель Конго Красный. Было обнаружено, что такие капсулы чувствительны к свету и можно управлять проницаемостью капсул, варьируя длительность освещения. Изменение проницаемости оболочки связано с разрушением агрегатов красителя вследствие освещения.

В работе [69] предложен метод разрушения капсул, основанный на включении молекул порфиринов в их оболочку. Лазерное облучение таких капсул в присутствии окислителя приводит к разрушению капсулы. Вследствие поглощения лазерной энергии возбужденные молекулы порфирина передают свою энергию окислителю, который производит гидроксильные радикалы, обладающие высокой реакционной способностью. Образование радикалов приводит к нарушению взаимодействия между слоями полиэлектролитов.

В [50] в оболочку полиэлектролитных капсул включали краситель IR-806, поглощающий свет в инфракрасной области спектра, и освещали лазером с длиной волны 830 нм. Освещение с мощностью 60 мВт привело к деформации капсул, содержащих краситель, в то время как с капсулами без красителя не произошло никаких изменений.

Таким образом, исследование полиэлектролитных микрокапсул, модифицированных молекулами органических красителей, имеет как практический, так и научный интерес, поскольку позволяет исследовать механизм переноса и диссипации энергии фотовозбужденных молекул в органической матрице, а также процессы фотосенсибилизированной перестройки и разрушения таких структур.

1.3.3 Капсулирование флуоресцентных красителей

В настоящее время капсулирование флуоресцентных красителей используют для визуализации капсул в люминесцентном микроскопе, а также для изучения их проницаемости. Уже проведен ряд работ по капсулированию красителей, таких как 6-карбоксифлуоресцеин, родамин 6 Ж, 1,1с-диэтилкарбоцианин и псевдоизоцианин [21], Disperse Red-1 [70] и др. Одновременное капсулирование красителя и магнитных частиц позволяет исследовать влияние магнитного поля на такие системы, что крайне важно для разработки методов целевой доставки [71].

Для использования капсул, заполненных красителем, в качестве люминесцентных зондов необходимо использование красителей, высокочувствительных к изменениям окружающей среды, например таких, как цианиновые красители. Цианиновые красители в водных растворах при высоких концентрациях, а также при добавлении солей, способны образовывать молекулярные агрегаты с аномально узкой и высокоинтенсивной полосой поглощения, смещённой в длинноволновую область спектра относительно полосы неагрегированной формы красителя. Эти агрегаты получили название J-агрегатов [72,73]. J-агрегаты представляют собой самоорганизованные квазиодномерные агрегированные структуры, состоящие из десятков тысяч исходных молекул красителя. Их структура занимает промежуточное положение между аморфной и кристаллической структурой.

1.4 Многокомпонентные капсулы

Флуоресцентные красители можно использовать как модельное или функциональное содержимое многокомпонентных капсул. Многокомпонентные капсулы, то есть нескольких капсул, соединенных между собой могут найти применение в качестве систем доставки и зондов. Создание таких систем позволит

повысить функциональность капсул, например, в случае, когда необходимо доставить одновременно несколько веществ и при этом эти вещества не должны взаимодействовать между собой, а также с окружением. Примеры таких систем – комбинация липосом и полиэлектролитных капсул [74], многокомпонентные мицеллы [75]. Двухкомпонентные капсулы могут применяться для контролируемого смешивания двух или нескольких веществ внутри капсулы. Разделение между ячейками может быть дистанционно разрушено. В [76] была получена система, когда одна капсула с золотыми наночастицами в оболочке находилась внутри другой капсулы и при освещении лазером перегородка разрушалась и происходило смешивание компонентов двух ячеек. Сочетание микрокапсул и липосом в одной многокомпонентной капсуле позволяет одновременно доставить низкомолекулярные вещества и большие молекулы. В [77] липосомы, внутри которых находился субстрат, были адсорбированы на поверхность капсул, содержащих фермент. С помощью воздействия ультразвука липосомы были разрушены и внутри капсулы происходила ферментативная реакция.

Поскольку внутрь капсул могут быть включены молекулы, чувствительные к различным физико-химическим параметрам, капсулы могут использоваться в качестве зондов. Полиэлектролитные капсулы могут быть перспективны для применения в качестве внутриклеточных зондов, определяющих pH [78], концентрацию глюкозы [79, 80]. Капсулы, содержащие вещества, чувствительные к концентрациям ионов K^+ или Ca^+ , могут применяться для определения этих параметров в различных частях клетки. Многокомпонентные капсулы, в которых в одном носителе объединены сенсоры, чувствительные к различным ионам, могут служить для измерения концентраций двух или нескольких ионов одновременно в одной области.

1.5 Биоразлагаемые полиэлектролиты в составе оболочки капсул

Полиэлектролиты для получения капсул. Для биомедицинского применения капсул необходимо получать капсулы из биосовместимых и биоразлагаемых полимеров, которые не токсичны и могут расщепляться, например, под действием ферментов [81]. В настоящее время для создания капсул используются различные

биосовместимые полиэлектролиты: полисахариды, такие как декстран сульфат, хитозан и полипептиды например, из полиаргинин, полиаспарагиновая кислота, полилизин и другие [82]. Такие капсулы нетоксичны для клеток [83, 84].

Расщепление оболочки капсулы под действием ферментов.

Полиэлектролитная оболочка из биodeградируемых полимеров может быть разрушена действием соответствующего фермента. В [85] полиэлектролитная пленка из гиалуроновой кислоты и хитозана была разрушена с помощью лизоцима и гиалуронидазы. В [86] впервые была продемонстрирована возможность разрушения капсул, состоящих из полиаргинина и декстрансульфата. Было показано, что через 2 часа инкубирования в 1 мг/мл растворе проназы капсулы полностью исчезают. Разрушение капсул происходит из-за того, что проназа расщепляет полиаргинин и оболочка распадается. Также при помещении в клетки продемонстрировано полное исчезновение капсул после инкубации в течение 60 часов. В [87] капсулы из декстрансульфата и поли-L-аргинина исследовали *in vivo*: через 16 дней после подкожного введения большинство из микрокапсул проникает в клетки и происходит постепенная деградация. С увеличением числа слоев полиэлектролитов повышается стабильность микрокапсул после поглощения клетками. Капсулы, состоящие из декстрансульфата и хитозана, были успешно разрушены при добавлении хитозаназы [88]. Разрушение капсул с помощью фермента является эффективным способом высвобождения закапсулированного материала. Например, в [89] было показано постепенное расщепление оболочки из полипептидов полиаргинина и полиспаргиновой кислоты под действием проназы, помещенной внутрь оболочки. При этом происходило высвобождение ДНК, помещенной в капсулы.

В работе [23] впервые *in vivo* продемонстрирована эффективность действия полиэлектролитных капсул, загруженных лекарством. Микрокапсулы, состоящие из полисахаридов хитозана и альгината, были загружены противоопухолевым препаратом доксорубицином. Эксперименты на культуре клеток и *in vivo* показали, что закапсулированный препарат может эффективно индуцировать апоптоз опухолевых клеток, при этом доксорубицин в капсулах проявлял лучшую эффективность, чем такая же доза свободного лекарства.

Для расщепления оболочки капсул из полипептидов обычно в качестве фермента используют проназу. Проназа представляет собой комплекс протеиназ, получаемых из внеклеточной жидкости штамма *Streptomyces griseus*. Этот комплексный препарат состоит из четырех нейтральных, трех щелочных протеиназ и трех-пяти аминопептидаз и карбоксипептидаз. Карбоксипептидазы — ферменты, гидролизующие белки, отщепляя аминокислоты от С-конца пептида, аминопептидазы — от N-конца. Проназа позволяет разорвать почти все пептидные связи между аминокислотами в любом белке и в синтетических полипептидах. [90, 91]. Это стабильный ферментный препарат, обладающий широкой специфичностью и способностью глубоко (на 70–90 %) гидролизовать субстрат до аминокислот. Молекулярная масса компонентов проназы составляет от 20000 до 60000 г/моль.

1.6 Выводы из литературного обзора и постановка задачи исследования

Метод полиионной сборки – довольно простой и эффективный способ получения устойчивых микрокапсул с регулируемой проницаемостью. Оболочки полиэлектролитных капсул можно модифицировать наночастицами металлов для дистанционного разрушения лазерным воздействием с целью высвобождения содержимого капсулы в нужном месте в нужное время. Одним из способов модификации оболочки является включение в ее состав наночастиц серебра с помощью реакции серебряного зеркала. В литературе показано, что в растворе и на поверхности подложки, варьируя параметры реакции, можно получать наночастицы серебра различной формы, размера, дисперсности. Однако возможности управления свойствами получаемых наночастиц не были в полной мере использованы для оболочек полиэлектролитных капсул. Задачей работы было изучить механизм образования наночастиц серебра на оболочке полиэлектролитных капсул при проведении реакции серебряного зеркала в суспензии капсул.

В литературе показано, что молекулы красителей могут быть включены в полиэлектролитные капсулы или в состав их оболочки. Такие системы перспективны в качестве сенсорных систем, но систематические исследования, посвященные капсулированию красителей различного типа в полиэлектролитные оболочки до сих пор отсутствовали.

Для слоев красителя на поверхности полупроводника показано, что при поглощении излучения молекулы красителя могут передавать энергию окружающим молекулам при совпадении колебательных частот у красителя и окружения. Вопрос о сенсibilизированном разрушении капсул оставался открытым. Поэтому одной из целей работы было использовать этот эффект для разрушения полиэлектролитной оболочки под действием лазерного излучения.

Полиэлектролитная оболочка, состоящая из биоразложимых полиэлектролитов, может быть разрушена воздействием соответствующего фермента. В частности, для разрушения оболочки из полипептидов эффективна проназа. Задачей работы было использовать ферментативное разрушение оболочки, содержащей биоразложимые полиэлектролиты, для разделения многокомпонентных капсул.

Микрочастицы карбоната кальция биосовместимы, они обладают большим объемом пор, благодаря чему хорошо адсорбируют различные соединения. Поэтому их перспективно использовать в качестве основы контейнеров для доставки функциональных соединений. Одной из задач работы было получение контейнеров назальной доставки лекарственных веществ на основе микрочастиц карбоната кальция, покрытых полиэлектролитной оболочкой.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1. Материалы и реактивы

В работе были использованы следующие вещества:

Полистиролсульфонат натрия, м.м. 70 кДа, “Aldrich” (Германия)

Полиаллиламин гидрохлорид, м.м. 70 кДа, “Aldrich” (Германия)

Полидиаллилдиметиламмоний, м.м. 200-300 кДа, “Aldrich” (Германия)

Поли-L-аргинин гидрохлорид, м.м. 70 кДа, “Aldrich” (Германия)

Поли-L-аспарагиновая кислота натриевая соль, м.м. 15 кДа, “Aldrich” (Германия)

Поли-L-глутаминовая кислота натриевая соль, м.м. 50-100 кДа, “Aldrich” (Германия)

Флуоресцеин изотиоцианат-декстран, м.м. 70 кДа, “Aldrich” (Германия)

Тетраметилпродамин изотиоцианат-полиаллиламин, м.м. 70 кДа

Тетраметилпродамин изотиоцианат –декстран, м.м. 70 кДа, “Aldrich” (Германия)

Флуоресцеин изотиоцианат, “Sigma-Aldrich” (Германия)

Родамин 6Ж, “Sigma-Aldrich” (Германия)

Пиридиниевая соль 3,3'-ди-(γ-сульфопропил)-4,4',5,5'-дибензо-9-этилтиакарбоцианинбетаина (краситель I) был синтезирован в Центре фотохимии РАН

3,3'-диэтилтиакарбоцианин йодид (краситель II)

Перилен

Микрочастицы диоксида кремния с диаметрами 4.8 и 0.58 мкм, Microparticles GmbH, (Германия)

Микрочастицы полистирола с диаметром 4.4 и 1 мкм, ООО «Диафарм» (Санкт-Петербург, Россия)

Ацетальдегид, “Acros Organics” (США)

Хлорид натрия, “Acros Organics” (США)

Хлорид кальция, “Acros Organics” (США)

Карбонат натрия, “Acros Organics” (США)

Тринатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), “Sigma-Aldrich” (Германия)

Тетрагидрофуран, «Иреа2000» (Россия)

Гидроксид аммония, “Fluka” США)

Нитрат серебра, «Реахим» (Россия)

Проназа, “Roche” (Германия)

Лоперамид гидрохлорид, “Sigma” (Германия)

Гиалуроновая кислота, компания «Натуральные ингредиенты» (Россия)

2.2. Методики получения образцов

Получение микрочастиц карбоната кальция. Сферические коллоидные частицы CaCO_3 были получены смешиванием растворов CaCl_2 и Na_2CO_3 с концентрацией 0.33 М. Реакционную смесь перемешивали со скоростью 500 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре. В результате были получены сферолиты со средним диаметром 4.5 ± 0.5 мкм.

Для получения меньших по размеру частиц карбоната кальция к 2 мл 0.3 М растворов CaCl_2 и Na_2CO_3 было добавлено по 10 мл этиленгликоля. Реакционную смесь перемешивали со скоростью 700 об/мин в течение 3 часов при комнатной температуре. В результате были получены сферолиты со средним диаметром 0.6 ± 0.2 мкм (Рис. 4).

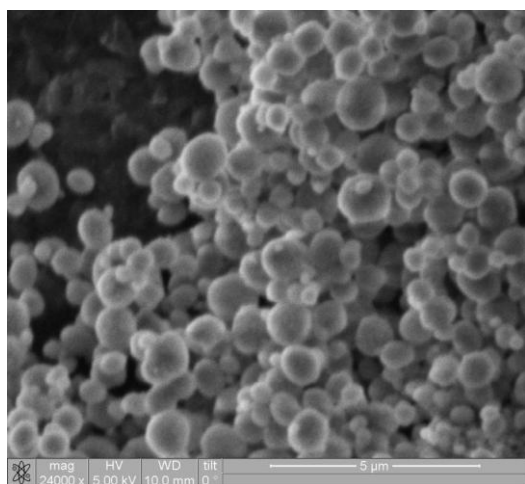


Рис. 4. СЭМ изображение микрочастиц карбоната кальция, полученных с использованием этиленгликоля.

После завершения процесса частицы CaCO_3 отмывали от ионов Na^+ и Cl^- дистиллированной водой и высушивали в сушильном шкафу в течение 2 ч при 70°C .

Получение полиэлектролитной оболочки. Для формирования полиэлектролитной оболочки использовали ядра из полистирола, диоксида кремния и карбоната кальция различных диаметров, полиэлектролиты – синтетические (отрицательно заряженный полистиролсульфонат и положительно заряженные полиаллиламин и полидиаллилдиметиламмоний) и биоразложимые (положительно заряженный поли-L-аргинин и отрицательно заряженные поли-L-спарагиновую кислоту и поли-L-глутаминовую кислоту) (Рис. 5).

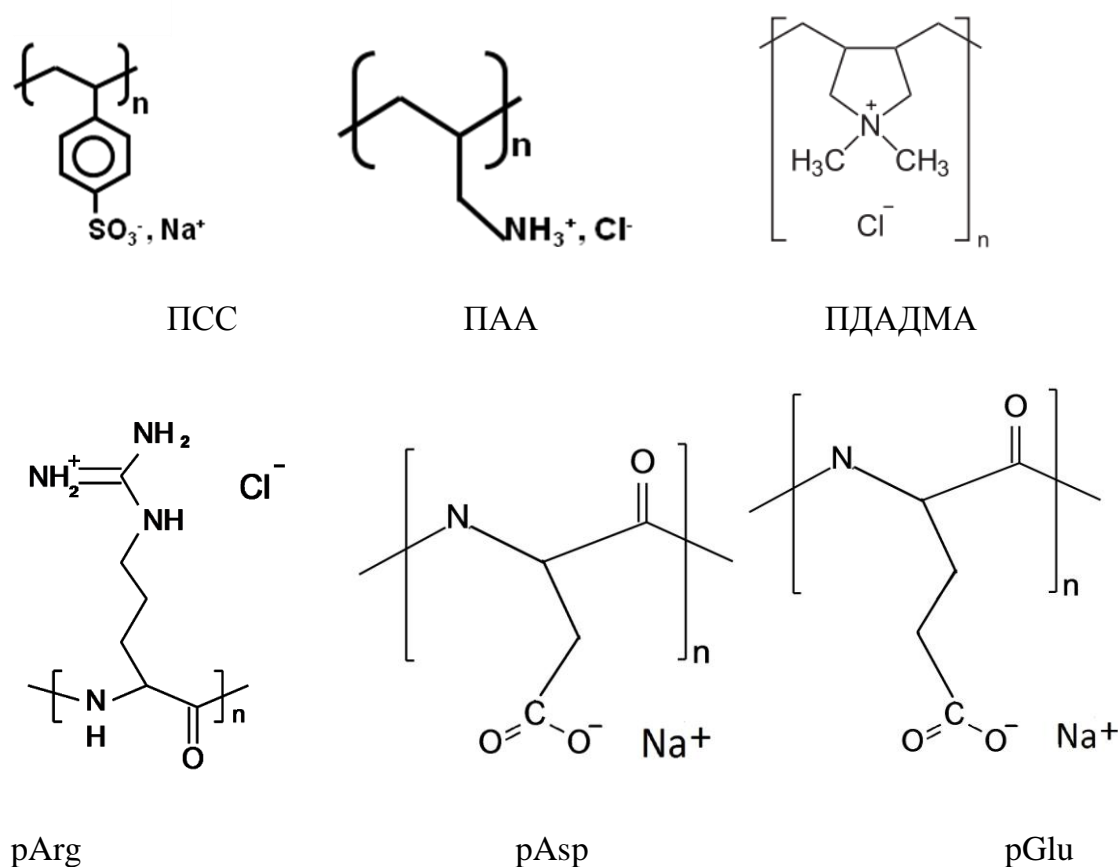


Рис. 5. Химические формулы используемых полиэлектролитов.

Ядра карбоната кальция, полистирола и диоксида кремния имеют отрицательный поверхностный заряд, поэтому в качестве первого слоя наносили положительный полиэлектролит (ПАА, ПДАДМА или PArg). Для этого к 0.015 г ядер добавляли 2 мл раствора полиэлектролита. Растворы полиэлектролитов имели концентрацию 2

мг/мл в 0.5 М растворе NaCl (для синтетических) и 0.15 М растворе NaCl (для биоразложимых полиэлектролитов). Суспензию перемешивали в течение 15 мин с помощью минишейкера, затем центрифугировали 3 мин при ускорении 330 g, после чего отбирали субстрат, а частицы трехкратно промывали водой (осаждение центрифугированием, 330 g, 3 мин). Частицы с размером 1 и 0.48 мкм центрифугировали при ускорении 8000 g. Затем проводили такую же процедуру, используя раствор отрицательного полиэлектролита (ПСС, pAsp или pGlu). Далее методом поочередной адсорбции противоположно заряженных макромолекул на коллоидных частицах получали оболочку, состоящую из нужного числа слоев. Для предотвращения агрегации частиц при нанесении первых двух слоев пробирки с суспензией помещали на 10 с в ультразвуковую ванну (35 кГц).

Формирование наночастиц серебра на поверхности микрочастиц карбоната кальция и в оболочке капсул. Для получения наночастиц серебра в составе полиэлектролитной оболочки и на поверхности микрочастиц использовали реакцию серебряного зеркала. Для этого вначале получали комплекс серебра $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$ добавлением к 500 мкл 0.5 М раствора AgNO_3 500 мкл 0.5 М раствора NH_4OH . Затем к 2 мл суспензии капсул или микрочастиц карбоната кальция ($\sim 10^8$ частиц) добавляли свежеприготовленный 5%-ый раствор $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$ и 10 или 20 мкл ацетальдегида. Пробирку со смесью помещали в минишейкер на время от 2 до 60 минут. Затем суспензию капсул трехкратно промывали водой. В результате капсулы приобретали серый цвет, что свидетельствует об образовании частиц серебра.

Образцы были получены с использованием различного соотношения реагентов и разного времени протекания реакции (табл. 1). Часть образцов во время реакции была помещена в ультразвуковую ванну для более интенсивного перемешивания реакционной смеси.

Для изучения влияния температуры реакции на размер полученных наночастиц серебра (образцы 12-15) к 1.5 мл суспензии капсул добавляли 30 мкл раствора $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$ и 20 мкл ацетальдегида. Реакция проводилась в течении 1 мин при температуре 20 °С и 50 °С, и затем капсулы 3 раза промывались водой.

Таблица 1

Условия получения наночастиц серебра в оболочках полиэлектролитных капсул с помощью реакции серебряного зеркала

ядра, на которых получены капсулы	номер образ-ца	количество комплекса $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$ на 10^8 капсул, моль $\cdot 10^{-6}$	количество ацетальдегида на 10^8 капсул, моль $\cdot 10^{-4}$	время реакции, мин	температура, $^{\circ}\text{C}$
полистирол	1	16	2	4	25
	2	16	2	6	25
	3	16	2	8	25
	4	16	4	7	25
	5	16	4	26	25
	6	16	4	60	25
	7	16	2	5	25
	8	16	2	5	25 у/з
	9	9.5	2	3	20
	10	9.5	2	3	50
	11	8	2	15	25
	12	16	2	15	25
	13	19	4	15	25
CaCO_3	14	9.5	2	3	20
	15	9.5	2	3	50

	16	19	4	15	25
	17	16	4	50	25

Включение в оболочку капсул молекул флуоресцентных красителей. После адсорбции на поверхность ядер CaCO_3 четырех полиэлектролитных слоев $(\text{ПДАДМА/ПСС})_2$ эти частицы были помещены в 10^{-3} М водный раствор родамина 6Ж и суспензия перемешивалась с помощью минишейкера в течение 30 мин. После этого спектрофотометрически было показано, что краситель полностью адсорбируется на капсулах – в супернатанте отсутствует соответствующий пик поглощения. Был измерен зета-потенциал частиц карбоната кальция с нанесенными слоями полиэлектролитов с последним слоем ПДДА и родамина 6Ж. Величина зета-потенциала для оболочки $(\text{ПДДА/ПСС})_2/\text{ПДДА}$ составляла 20 мВ, а для $(\text{ПДДА/ПСС})_2/\text{Р6Ж}$ -8.6 мВ. Следовательно, можно сделать вывод, что после адсорбции красителя перезарядки поверхности не происходит, и поэтому для получения стабильной структуры после слоя родамина 6Ж наносили слой ПДДА. В итоге была получена оболочка с составом $\text{ПДДА/ПСС})_2 \text{ Р6Ж } (\text{ПДДА/ПСС})_2 \text{ Р6Ж } (\text{ПДДА/ПСС})$

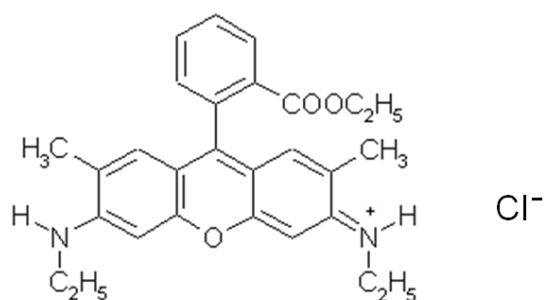


Рис. 6. Химическая формула Родамина 6Ж.

ФИТЦ включали в оболочку капсул двумя способами. В первом случае был получен полиаллиламин, химически связанный с красителем (ФИТЦ-ПАА). Во втором случае краситель был включен с помощью адсорбции на оболочку.

Для получения химически связанного красителя раствор ПАА с концентрацией 6 мг/мл в 0.1 М водном растворе гидрокарбоната натрия перемешивали в течение 3 часов на магнитной мешалке с раствором ФИТЦ в

диметилформамиде с концентрацией 20 мг/мл (1 мл первого и 100 мкл второго раствора). Затем полученную смесь осаждали ацетоном и высушивали в сушильном шкафу при 70°C. При получении оболочки при нанесении одного из слоев раствор ПАА был заменен на раствор ФИТЦ-ПАА с концентрацией 2 мг/мл в 0.5 М растворе NaCl.

Для адсорбции красителя после нанесения на поверхность ядер CaCO₃ пяти полиэлектролитных слоев (ПАА/ПСС)₂ПАА эти частицы были помещены в водный раствор ФИТЦ и суспензия перемешивалась с помощью минишейкера в течение 30 мин. Затем наносили слой ПСС. В результате получили оболочку с составом (ПАА/ПСС)₂ПАА /ФИТЦ/ ПСС/ (ПАА /ПСС)₂

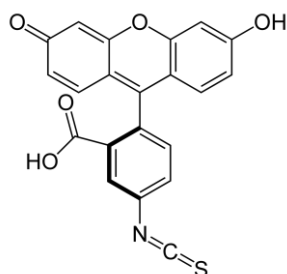


Рис. 7. Химическая формула флуоресцеина-изотиоцианата.

Растворение ядер. Получение полых полиэлектролитных оболочек – проницаемых капсул, осуществляли путем растворения ядер CaCO₃ при добавлении тринатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). В результате происходит удаление кальция из капсулы за счет образования устойчивого комплекса этого металла с ЭДТА. 0.2 М водный раствор ЭДТА с pH 7.5 приливали к суспензии капсул и перемешивали в течение 20 минут, затем суспензию три раза промывали водой (осаждение центрифугированием, 220 g, 8 мин). При использовании частиц полистирола растворение ядер проводили в тетрагидрофуране. Для этого к суспензии капсул приливали тетрагидрофуран и через 12 часов промывали один раз тетрагидрофураном, а затем три раза водой (осаждение центрифугированием, 220 g, 8 мин).

Капсулирование красителей. Для адсорбции на ядра красителя I, красителя II и перилена 2 мл 10⁻⁴ М раствора каждого красителя в этаноле был добавлено к 0,015 г CaCO₃ ядер и суспензия перемешивалась на шейкере в течение 1 часа.

После этого частицы промывали водой и наносили полиэлектролитную оболочку. Затем ядра растворяли..

Для капсулирования красителя I, красителя II и перилена полые полиэлектролитные капсулы были помещены в этанол в течение 15 мин, затем в 10^{-4} М раствор красителей в этаноле при перемешивании в течение 1 часа. После этого капсулы промывали водой.

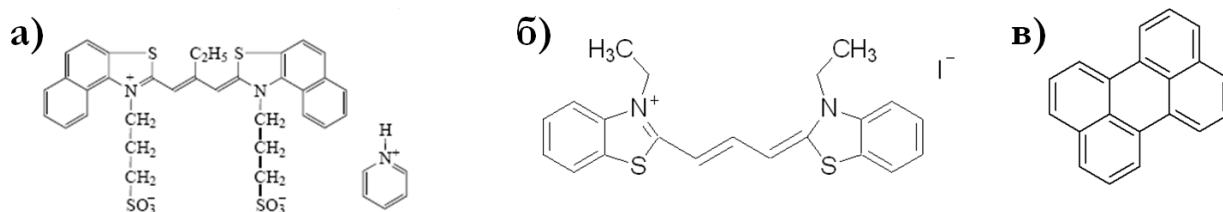


Рис. 8. Флуоресцентные красители:

а) 3,3'-ди-(γ-сульфопропил)-4,4',5,5'-добензо-9-этилтиакарбоцианинбетаин

(краситель I)

б) 3,3'-диэтилтиакарбоцианин йодид (краситель II)

в) перилен

Для капсулирования флуоресцеин изотиоцианат-декстрана к 13 мг ядер карбоната кальция со средним размером 4 мкм добавляли 2 мл раствора ФИТЦ-декстрана в 0.5 М NaCl с концентрацией 1 мг/мл и перемешивали в течение 1 часа. Затем частицы промывали водой и наносили полиэлектролитную оболочку. После этого ядра растворяли.

Воздействие лазерного излучения на модифицированные капсулы. Для воздействия лазерного излучения на капсулы с наночастицами серебра в оболочке использовали установку [49], в которой объект, помещенный на предметное стекло микроскопа, освещается лазером. Фокусировка объектива на исследуемый образец происходит одновременно с фокусировкой лазера. Процессы, происходящие с капсулами, наблюдаются с помощью видеокамеры. Длина волны лазера составляла 532 нм, мощность 100 мВт.

Суспензию капсул с родамином бЖ и ФИТЦ в оболочке облучали светом в полосе поглощения молекул красителей (вторая гармоника гранатового (Nd:YAG) лазера LF114 с длиной волны 532 нм, диаметр луча примерно 7 мм, энергия в импульсе 180-500 мДж, длительность импульса 10 нс, частота следования импульсов 10 Гц). Длительность облучения составляла 3 минуты.

Получение многокомпонентных микрочастиц и капсул. В качестве ядер внутренних частиц использовали микрочастицы карбоната кальция со средним размером 4 мкм, а наружных – микрочастицы полистирола с размером 1 мкм. На ядрах из карбоната кальция была получена полиэлектролитная оболочка со структурой (ПАА/ПСС)₂/ФИТЦ-ПАА/(ПСС/ПАА)₂, а на полистирольных частицах (ПАА/ПСС)₃/ТРИТЦ-ПАА/ПСС/(ПАА/ПСС)₂. Для адсорбции внешних частиц на поверхность внутренних 100 мкл суспензии полистирольных частиц с концентрацией 0.1 мг/мл и 100 мкл суспензии CaCO₃ частиц с концентрацией 1 мг/мл перемешивали в течение 10 мин с помощью шейкера. Для растворения ядер к капсулам последовательно добавляли тетрагидрофуран (для растворения полистирольных частиц) и двунатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (для растворения кальцийкарбонатных частиц).

Во втором случае в качестве ядер использовали микрочастицы диоксида кремния: с диаметром 4,8 мкм для внутренних частиц и 0,58 мкм – для внешних. Вначале на частицы была нанесена полиэлектролитная оболочка из синтетических и биоразложимых полиэлектролитов. На внутренних частицах была получена оболочка со структурой (ПАА/ПСС)₂/ФИТЦ-ПАА/ПСС/PArg/PAsp/PArg, а на внешних – (ПАА/ПСС)₂/ПАА/ФИТЦ-декстран/PArg/PAsp. Для адсорбции внешних частиц на поверхность внутренних 100 мкл суспензии внешних частиц с концентрацией 1.5 мг/мл и 100 мкл суспензии внутренних частиц с концентрацией 7.5 мг/мл перемешивали в течение 10 мин с помощью шейкера.

Воздействие фермента на оболочки, содержащие биоразложимые полиэлектролиты. 100 мкл суспензии частиц отцентрифугировали и залили 100 мкл раствора проназы с концентрацией 20 мг/мл. Суспензия перемешивалась с помощью шейкера при температуре 37°С в течение 1 ч. Эта температура соответствует максимуму протеолитической активности проназы.

Наблюдали воздействие проназы на капсулы со следующим составом:

- 1) капсулы с закапсулированным ФИТЦ-декстраном с составом оболочки (PArg/PGlu)₄ и (PArg/PGlu)₈
- 2) капсулы с закапсулированным ФИТЦ-декстраном с составом оболочки (pArg/pGlu)₃/ PАН/PSS
- 3) капсулы с закапсулированным ФИТЦ-декстраном с составом оболочки (pArg/pGlu)/ (PАН/PSS)₂ /pArg/pGlu
- 4) капсулы с закапсулированным ФИТЦ-декстраном с составом оболочки PАН/PSS/ (pArg/pGlu)₃
- 5) (PArg/PGlu)/TRITC-pArg/PGlu/ (PArg/PGlu)₂
- 6) (PArg/PGlu)/TRITC-pArg/PGlu/(PArg/PGlu)₆.

1 мл суспензии капсул отцентрифугировали, залили 0,5 мл раствора проназы с концентрацией 1 мг / мл или 5 мг/мл и инкубировали при 37°C в течение 3 часов. Так как активность проназы снижается через 2 часа, то после инкубирования в течение 2 часов суспензию центрифугировали и заливали новым раствором проназы. После различного времени инкубации капсулы центрифугировали и промывали деионизированной водой при температуре 3 °С.

Получение микроконтейнеров, содержащих лоперамид. Лоперамид адсорбировали на частицы карбоната кальция из спиртового раствора с концентрацией 1 мг/мл. 10 мг частиц карбоната кальция заливали 2 мл раствора лоперамида и выдерживали при перемешивании с помощью шейкера в течение 15 минут. После этого частицы промывали дистиллированной водой. Гиалуроновую кислоту адсорбировали на частицы из раствора с концентрацией 5 мг/мл в 0.2 М водном растворе NaCl. Для этого частицы с включенным лоперамидом помещали в раствор гиалуроновой кислоты и выдерживали при перемешивании с помощью шейкера в течение 15 минут. После этого частицы промывали дистиллированной водой и высушивали в сушильном шкафу при 70°C.

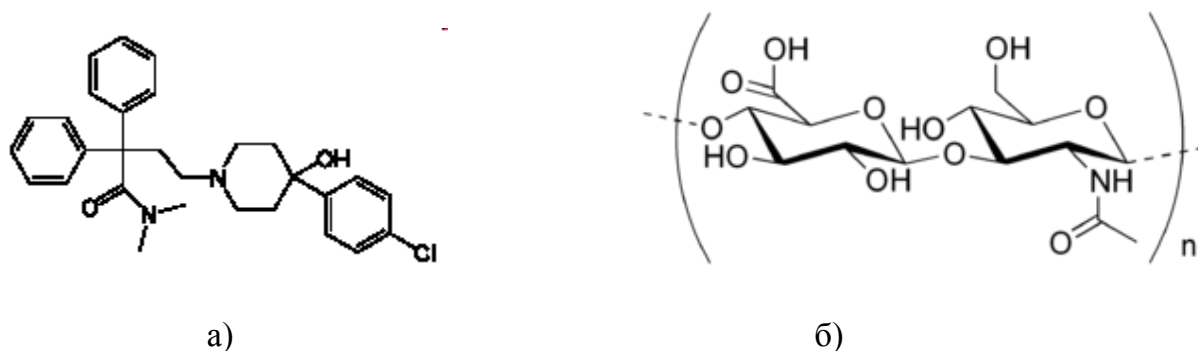


Рис. 9. Химические формулы лоперамида (а) и гиалуроновой кислоты (б).

2.3. Методы исследования

Исследование микрочастиц и капсул методом конфокальной сканирующей флуоресцентной микроскопии. Конфокальный микроскоп (Рис. 10) отличается от классического оптического микроскопа тем, что в каждый момент времени регистрируется изображение одной точки объекта, а полноценное изображение строится путем сканирования. Световые пучки от разных лазеров с помощью системы зеркал сводятся в один соосный пучок и через акустооптический перестраиваемый фильтр (АОПФ) заводятся в оптическую систему микроскопа. Акустооптический фильтр за счет быстро-изменяемой пропускающей способности на заданных длинах волн пропускает в микроскоп только то лазерное излучение, которое используется в данный момент для возбуждения флуоресценции, блокируя свет на остальных лазерных длинах волн. Также АОПФ позволяет быстро и точно изменять интенсивность возбуждающего света.

Светоделительное устройство эффективно подавляет свет на длине волны генерации лазера и пропускает через себя остальной свет. Это позволяет завести лазерный луч в объектив, а также с минимальными потерями пропустить собранный объективом флуоресцентный сигнал к системе детекции. Луч лазера проходит через объектив и фокусируется в заданную точку образца. С помощью системы из двух зеркал-сканеров лазерный луч перемещается от точки к точке в плоскости образца XY. Испускаемый образцом флуоресцентный сигнал собирается тем же объективом, а затем через конфокальную диафрагму и спектральную оптическую схему направляется на детектор - фотоэлектронный умножитель ФЭУ.

Конфокальная диафрагма помещается в сопряженной фокальной плоскости объектива, точнее, в той плоскости, где микроскоп фокусирует сигнал, собранный из фокуса объектива. В этом случае через диафрагму пройдет только та флуоресценция, которая испускается из небольшого объема вблизи фокуса лазерного луча под объективом (точка T_0). Сигналы, идущие от слоев выше и ниже фокуса (Точки T_- и T_+), оказываются дефокусированными на конфокальной диафрагме и через нее к ФЭУ не проникают. Диаметр конфокальной диафрагмы можно варьировать, тем самым изменяя толщину оптического слоя вблизи фокуса объектива, от которого измеряется сигнал.

Записав в памяти компьютера серию оптических срезов, можно провести объемную реконструкцию объекта и получить его трехмерное изображение.

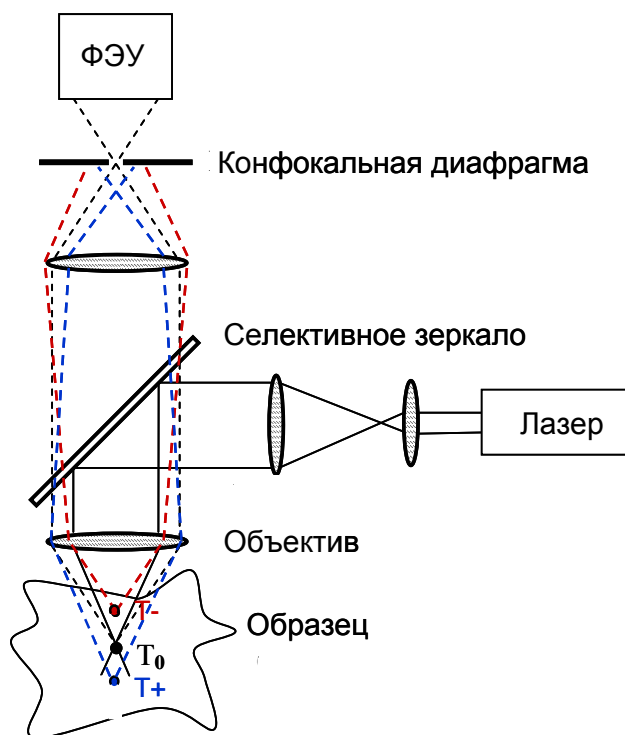


Рис. 10. Схема строения конфокального сканирующего флуоресцентного микроскопа.

Конфокальный микроскоп имеет такое же разрешение l_{\min} как и обычный микроскоп. Оно ограничено дифракционным пределом:

$$l_{\min} = \frac{0,61\lambda}{n \sin \alpha}$$

где λ - длина волны излучения, $n \sin \alpha$ — числовая апертура объектива, n — показатель преломления среды между образцом и объективом, α — половина угла, который «захватывает» объектив. В видимом диапазоне разрешение составляет ~ 250 нм.

Визуализацию капсул методом конфокальной сканирующей флуоресцентной микроскопии проводили с использованием микроскопа “Leica TCS SP”, (Германия). Прибор снабжен 100x иммерсионным объективом, имеющим цифровую апертуру 1,4. Лазер имеет четыре фиксированные длины волны возбуждения: 488, 514, 543 и 633 нм. Для возбуждения люминесценции Родамина 6Ж и ТРИТЦ использовали лазер с длиной волны 543 нм, для ФИТЦ – 488 нм.

Исследование адсорбции лоперамида на поверхность частиц с помощью спектрофотометрии. В спектрофотометре излучение лампы фокусируется зеркалами на входную щель монохроматора. Диспергирующее устройство (призма или дифракционная решетка) поворачивается вокруг оси так, чтобы в выходную щель монохроматора попала нужная узкая полоса спектра. Детектором служит фотоумножитель или фотоэлемент. Луч, выходящий из монохроматора, разделяется качающимся зеркалом на два одинаковых по интенсивности луча: один проходит через кювету сравнения, другой через кювету с образцом. Вращающейся диафрагмой перекрывают попеременно то луч сравнения, то луч образца, которые поочередно через соответствующие кюветы проходят на детектор. Сигнал с детектора усиливается и делится на два канала, специальная схема следит, чтобы сигнал сравнения был постоянным (регулируя ширину выходной щели монохроматора с помощью мотора). Регистрируется отношение степени пропускания световых лучей через кювету образца к пропусканию светового потока через кювету сравнения, либо непосредственно оптическую плотность.

Одно из наиболее широко используемых приложений УФ-видимой спектроскопии - это количественное определение концентрации веществ в газах и растворах. Для данного вещества оптическая плотность A на любой длине волны прямо пропорциональна концентрации c при фиксированной длине пути l . Для характеристики интенсивности полосы служит молярный коэффициент поглощения ϵ

$$e = A/Cl, \text{ где } A = -\lg(I/I_0),$$

Оптическая плотность экспериментально определяется как логарифм отношения интенсивностей падающего и прошедшего света.

Спектры поглощения суспензий капсул, содержащих красители, и растворов в ультрафиолетовой/видимой областях спектра снимали с помощью двулучевого сканирующего спектрофотометра Lambda-650 (Perkin-Elmer, Германия) с диапазоном длин волн 190 - 900 нм.

Определение размера капсул методом корреляционной спектроскопии рассеянного света.

Метод корреляционной спектроскопии рассеянного света основан на определении корреляционной функции интенсивности рассеянного света. Броуновское движение дисперсных частиц или макромолекул в жидкости приводит к флуктуациям локальной концентрации частиц. Результатом этого являются локальные неоднородности показателя преломления и соответственно - флуктуации интенсивности рассеянного света при прохождении лазерного луча через такую среду. Коэффициент диффузии частиц обратно пропорционален характерному времени релаксации флуктуаций интенсивности рассеянного света. Это характерное время, в свою очередь, есть время затухания экспоненциальной временной корреляционной функции рассеянного света, которая измеряется с помощью цифрового коррелятора. Размер частиц рассчитывается по формуле Стокса-Эйнштейна, которая связывает размер частиц с их коэффициентом диффузии и вязкостью жидкости.



Рис. 11. Схема метода корреляционной спектроскопии рассеянного света.

Методом корреляционной спектроскопии рассеянного света определяли размер микрокапсул. Источником света служил гелий-неоновый лазер ($\lambda=632,8$ нм) мощностью 25 мВт. Для устранения собственных шумов ФЭУ луч, рассеянный под

углом θ , с помощью делительной пластики разделялся на два ФЭУ Hamamatsu R6358P, работающих в режиме счета фотонов. Сигналы с ФЭУ после усиления поступали в одноплатный логарифмический 32-битный коррелятор Photocor-FC, измеряющий функцию взаимной корреляции в реальном масштабе времени при числе каналов 288 и 25 с на одну точку. Поскольку на ФЭУ попадает свет из одного рассеивающего объема, рассеянный под одним и тем же углом, то полученная функция корреляции эквивалентна корреляционной функции света, рассеянного образцом, так как собственные шумы двух ФЭУ не коррелированы.

Гидродинамический радиус микрокапсул R_h определяли из уравнения [92]

$$\Gamma = \frac{k_B T}{3\eta R_h} \cdot 8\pi \frac{n^2}{\lambda^2} \sin^2 \frac{\theta}{2},$$

где показатель преломления среды $n=1,33$; $\lambda=632,8$ нм; $T=295$ К; вязкость $\eta=0,89 \cdot 10^{-2}$ г/см·с, θ – угол рассеяния; k_B – постоянная Больцмана; Γ – диффузионное уширение, характеризующее ширину спектрального контура, которое определялось из корреляционной функции

$$G(\tau) = \int_0^{\infty} E(t)E(t+\tau) dt,$$

$E(t)$ – набор данных, измеряемых с шагом τ .

Нами было установлено распределение по размерам объектов, находящихся в растворах. Для этого были получены распределения $A(\Gamma(R_h))$ диффузионного уширения спектрального контура рассеянного света. Распределение числа частиц по размерам $N(R_h)$ определялось по формуле

$$N(R_h) = \frac{A(\Gamma(R_h))}{R_h^6}.$$

Измерение дзета-потенциала поверхности микрочастиц. Дзета-потенциал (электрокинетический потенциал) характеризует стабильность коллоидной системы. На поверхности коллоидных частиц образуется двойной электрический слой. Предложенная Штерном модель строения двойного электрического слоя

учитывает адсорбцию противоионов и их тепловое движение. Согласно этой модели, являющейся в настоящее время общепринятой, часть противоионов находится на расстояниях порядка диаметра иона от поверхности ядра, образуя т.н. слой Гельмгольца (адсорбционный слой противоионов), а другая часть образует диффузный слой (т.н. слой Гуи). Потенциал диффузной части двойного электрического слоя называют электрокинетическим потенциалом. Электрокинетический потенциал обычно обозначают греческой буквой ζ (дзета) и называют поэтому дзета-потенциалом. ζ -потенциал пропорционален заряду коллоидной частицы.

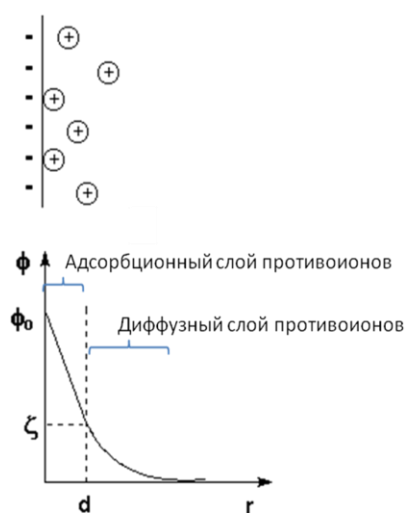


Рис. 12. Схема строения двойного электрического слоя.

Характерное значение ζ -потенциала составляет порядка 25 мВ, максимальное - 100 мВ. При значениях от 0 до ± 5 происходит коагуляция, значения больше ± 30 соответствуют стабильной системе. Зета потенциал не может быть измерен непосредственно, он вычисляется из измеренной электрофоретической подвижности. Если поместить золь в постоянное электрическое поле, то, как и в растворах электролитов, заряженные частицы будут двигаться к противоположно заряженным электродам: коллоидная частица с адсорбированными на ней противоионами – в одну сторону, противоионы диффузного слоя – в другую. Сила, с которой электрическое поле действует на частицы и, следовательно, скорость движения частиц, будет пропорциональна ζ -потенциалу.

Скорость движения частиц дисперсной фазы при электрофорезе прямо пропорциональны напряженности электрического поля E и диэлектрической

проницаемости дисперсионной среды ε и обратно пропорциональны вязкости среды η . Скорость движения частиц дисперсной фазы при электрофорезе U связана с величиной ζ -потенциала уравнением Гельмгольца-Смолуховского (K – постоянная, зависящая от формы частиц дисперсной фазы; для сферических частиц $K = 6$) [93]:

$$\zeta = \frac{K\eta U}{\varepsilon \cdot E}$$

Зета-потенциал микрочастиц, покрытых полиэлектролитной оболочкой, определяли с помощью анализатора частиц Malvern Zetasizer 4.

Исследование микрочастиц и капсул методом сканирующей электронной микроскопии. Сканирующий электронный микроскоп - прибор, основанный на

взаимодействии электронного пучка с веществом, предназначенный для получения изображения поверхности объекта с высоким пространственным разрешением, а также о составе и строении приповерхностных слоёв. Принцип работы сканирующего электронного микроскопа заключается в сканировании поверхности образца сфокусированным электронным пучком энергий (10 — 50 кэВ) и анализе отраженных от поверхности частиц и возникающего в результате взаимодействия электронов с веществом рентгеновского излучения. Анализ частиц позволяет получать информацию о рельефе поверхности, о фазовом различии и кристаллической структуре приповерхностных слоёв. Анализ рентгеновского излучения, возникающего в процессе взаимодействия пучка электронов с образцом дает возможность качественно и количественно охарактеризовать химический состав приповерхностных слоёв. Электронный пучок направляется на анализируемый образец. В результате взаимодействия между электронным зондом и образцом возникают низкоэнергетичные вторичные электроны, которые отбираются детектором вторичных электронов. Каждый акт столкновения сопровождается появлением электрического сигнала на выходе детектора. Интенсивность электрического сигнала зависит как от природы образца (в меньшей степени), так и от топографии (в большей степени) образца в области взаимодействия. Таким образом, сканируя электронным пучком поверхность объекта возможно получить карту рельефа проанализированной зоны.

Изображения, полученные в режиме отраженных электронов, несут в себе информацию о распределении различных элементов в образце, поскольку интенсивность сигнала отраженных электронов напрямую связана со средним атомным номером засвечиваемой области образца.

Пространственное разрешение сканирующего электронного микроскопа зависит от поперечного размера электронного пучка, который, в свою очередь, зависит от электронно-оптической системы, фокусирующей пучок. Разрешение также ограничено размером области взаимодействия электронного зонда с образцом. Размер электронного зонда и размер области взаимодействия зонда с образцом намного больше расстояния между атомами мишени. Таким образом, разрешение сканирующего электронного микроскопа не достаточно для отображения атомных плоскостей и даже атомов, в отличие от современных просвечивающих микроскопов. Тем не менее, растровый электронный микроскоп имеет ряд преимуществ перед просвечивающим микроскопом. Это визуализация сравнительно большой области образца, исследование массивных объектов (а не только тонких пленок), набор аналитических методов, позволяющих измерять состав и свойства изучаемого объекта. В зависимости от конкретного прибора и параметров эксперимента, может быть получено разрешение от десятков до единиц нанометров.

Изображения микрочастиц, покрытых полиэлектролитной оболочкой, и полых полиэлектролитных капсул получали с помощью растровых электронных микроскопов Jeol 7401F и FEI-Philips XL 30. Измерения на микроскопе FEI-Philips XL 30 проводили в режиме работы со средой (при наличии в камере водяных паров, что обеспечивает влажность вплоть до 100%). Это предотвращает высыхание образца.

Определение размеров микрочастиц карбоната кальция и наночастиц серебра с помощью программы ImageJ. Размеры микрочастиц карбоната кальция и наночастиц серебра по СЭМ изображениям определяли с помощью программы для анализа и обработки изображений ImageJ. Вначале измеряли размеры 100 частиц и затем определяли средний размер.

Исследование нанокomпозитных капсул методом просвечивающей электронной микроскопии. В просвечивающем электронном микроскопе пучок электронов, проходя сквозь специально подготовленный образец, оставляет его изображение на экране. Этот метод позволяет наблюдать тонкие особенности и детали структуры микрообъектов на атомно-молекулярном уровне, производить визуальное наблюдение и фотографирование изображения объекта в широком диапазоне увеличений, получать дифракционные картины от объектов. Обычно увеличение, обеспечиваемое просвечивающим электронным микроскопом, составляет от 200 до 300000. Теоретическая разрешающая способность просвечивающего электронного микроскопа имеет величину порядка длины волны электронов, однако, из-за наличия дефектов электронной оптики (хроматической и сферической аберрации, астигматизма) реальная разрешающая способность электронных микроскопов на 2 - 3 порядка хуже теоретической. Тем не менее, просвечивающая электронная микроскопия дает возможность получить изображения с высоким разрешением, вплоть до атомного (~ 0,1 нм). Объектами исследования могут быть тонкие пленки и диспергированные совокупности частиц. Лучшие результаты электронная микроскопия дает для пленок с толщиной, сравнимой с длиной свободного пробега электрона.

Капсулы с наночастицами серебра в составе оболочки исследовались с помощью микроскопа FEI Tecnai G²30ST с ускоряющим напряжением 300 кВ и разрешением по точкам 2.0 Å.

Исследование капсул методом атомно-силовой микроскопии. В основе работы атомно-силового микроскопа (АСМ) лежит силовое взаимодействие между зондом и поверхностью, для регистрации которого используются специальные зондовые датчики, представляющие собой упругую консоль с острым зондом на конце. Сила, действующая на зонд со стороны поверхности, приводит к изгибу консоли. Регистрируя величину изгиба, можно контролировать силу взаимодействия зонда с поверхностью. Зонд АСМ испытывает притяжение со стороны образца на больших расстояниях и отталкивание на малых. Недостатком контактных АСМ методик является непосредственное механическое взаимодействие зонда с поверхностью. Это часто приводит к поломке зондов и разрушению поверхности образцов. Кроме того, контактные методики практически

не пригодны для исследования образцов, обладающих малой механической жесткостью (структуры на основе ряда органических материалов и многие биологические объекты). Для исследования таких образцов применяется колебательная (полуконтактная) АСМ методика, основанная на регистрации параметров взаимодействия колеблющегося кантилевера с поверхностью. При работе в этом режиме возбуждаются вынужденные колебания кантилевера вблизи резонанса с амплитудой порядка 10 – 100 нм. Кантилевер подводится к поверхности так, чтобы в нижнем полупериоде колебаний происходило касание поверхности образца. Взаимодействие кантилевера с поверхностью в полуконтактном режиме состоит из ван-дер-ваальсового взаимодействия, к которому в момент касания добавляется упругая сила, действующая на кантилевер со стороны поверхности. В результате взаимодействия зонда с поверхностью образца происходит изменение частоты и фазы колебаний. Это изменение регистрируется при сканировании образца. Распределение фазового сдвига по поверхности отражает распределение характеристик материала образца. Регистрация и отображение фазового сдвига в процессе сканирования широко используется в исследованиях наноструктурированных и неоднородных материалов.

Распределение наночастиц золота и серебра в полиэлектролитной матрице изучали полуконтактным методом атомно-силовой микроскопии. Изображение поверхности оболочки капсулы на воздухе было получено с помощью сканирующего зондового микроскопа “Solver BIO” (NT-MDT, Россия) с кремниевым зондом NSG10 с резонансной частотой 211 кГц. Полиэлектролитные капсулы из биоразложимых полиэлектролитов до и после воздействия фермента изучали с помощью микроскопа Nanoscope III Multimode AFM (Digital Instruments, Maynard, Massachusetts).

Глава 3. Модифицированные полиэлектролитные капсулы и их разрушение

Включение в оболочку полиэлектролитных капсул наночастиц металлов может обеспечить высвобождение закапсулированного вещества с помощью лазерного излучения, длина волны которого совпадает с пиком поглощения наночастиц. Наночастицы, находящиеся в оболочке, поглощают это излучение и преобразуют его в тепло. Другим способом обеспечения чувствительности капсул к лазерному излучению может быть включение в их оболочку молекул органических красителей. Внедрение в структуру капсул молекул красителя приводит к возможности фотосенсибилизированного разрушения таких структур. Облучение квантами света в полосе поглощения внедренных молекул может приводить к их эффективному возбуждению и, при определенных условиях, к переносу энергии к оболочке капсулы, сопровождающемуся ее перестройкой и даже разрушением. Другим способом разрушения капсул является ферментативное расщепление оболочки, состоящей из биоразложимых полиэлектролитов.

3.1 Синтез наночастиц серебра на микрочастицах CaCO_3 и полиэлектролитных оболочках

Формирование наночастиц серебра на микрочастицах карбоната кальция.

Для определения влияния полиэлектролитных слоев на формирование наночастиц серебра с помощью реакции серебряного зеркала наночастицы серебра были получены на поверхности микрочастиц карбоната кальция без полиэлектролитной оболочки и с адсорбированным слоем полиэлектролита.

Изображения микрочастиц карбоната кальция с размером 0.6 ± 0.2 мкм с полученными на поверхности наночастицами серебра показаны на рис. 13. Частицы CaCO_3 имеют слабоотрицательный поверхностный заряд [27], поэтому можно предположить, что катионы серебра будут адсорбироваться на поверхность сферолитов электростатически и затем восстанавливаться под действием ацетальдегида. На поверхности CaCO_3 образовались наночастицы серебра треугольной формы, средний размер которых (длина стороны треугольника) составляет 99 ± 20 нм (рис. 13). Видно, что наночастицы равномерно распределены

по поверхности микросферолитов. Кроме этого в системе присутствуют довольно крупные (размером до нескольких микрон) агрегаты серебра (рис. 13). Это объясняется тем, что в ходе реакции происходит образование наночастиц серебра как на поверхности частицы карбоната кальция, так и в растворе. При этом наночастицы серебра, образовавшиеся на поверхности микрочастиц, частично стабилизированы за счет взаимодействия с поверхностью, поэтому их агрегация, в отличие от наночастиц в растворе, не столь велика.

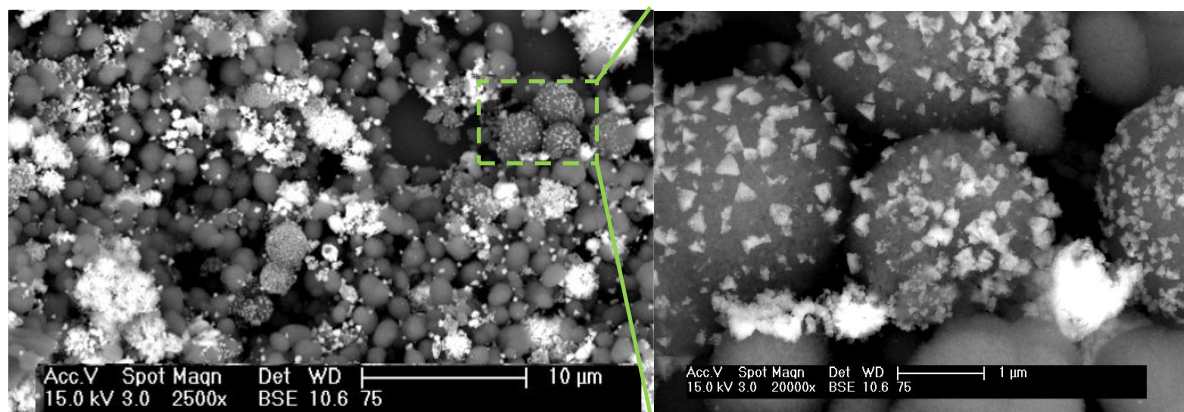
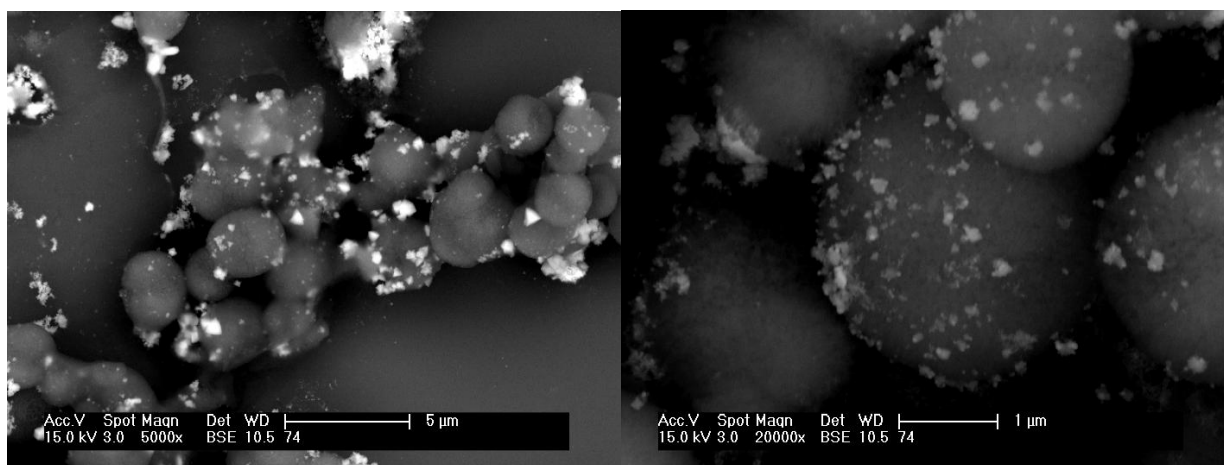


Рис. 13. Изображение микрочастиц карбоната кальция с размером 0.6 ± 0.2 мкм с наночастицами серебра, полученное методом сканирующей электронной микроскопии.

Таким же способом были получены наночастицы серебра на поверхности больших микрочастиц карбоната кальция (со средним размером 4.5 мкм). В этом случае средний размер наночастиц составил 60 ± 40 нм (Рис 14).

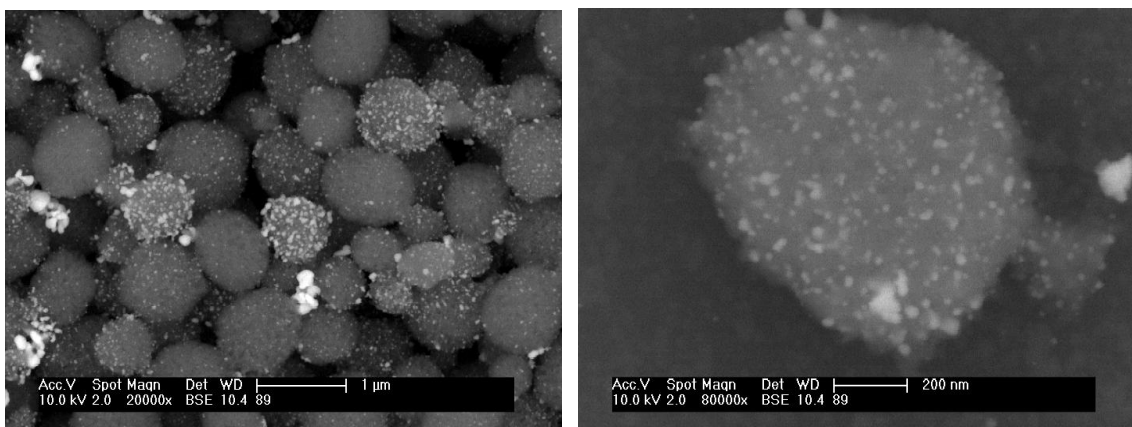


а)

б)

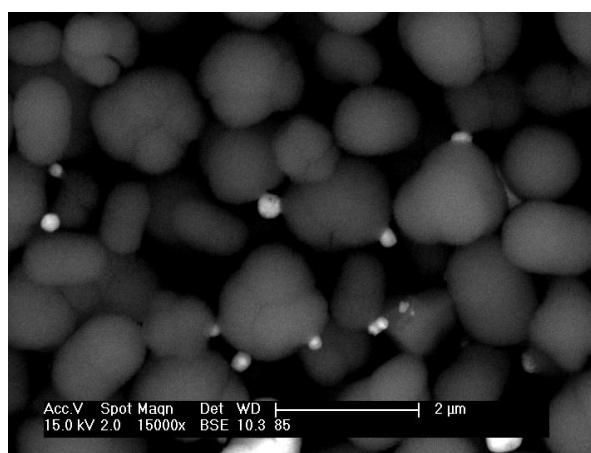
Рис. 14. Изображение микрочастиц карбоната кальция со средним размером 4.5 мкм с наночастицами серебра, полученное методом сканирующей электронной микроскопии.

Далее с помощью реакции серебряного зеркала были получены наночастицы серебра на поверхности микрочастиц карбоната кальция, покрытых одним полиэлектролитным слоем (Рис. 15). Видно, что заряд полиэлектролита влияет на количество серебра: на поверхности частиц, покрытых отрицательно заряженным ПСС (Рис. 15 а, б), образуется большее количество наночастиц, чем в случае положительно заряженного ПАА (Рис. 15 в). Размер наночастиц, сформированных на слое ПСС, составляет 21 ± 7 нм, а на слое ПАА – 250 ± 100 нм. Наблюдаемые результаты подтверждают выводы о механизме образования наночастиц серебра на поверхности микрочастиц, сделанные ранее. Ионы серебра имеют положительный заряд, поэтому благодаря электростатическому взаимодействию они адсорбируются на поверхность микрочастицы, покрытую слоем полианиона, и там восстанавливаются. Образующиеся частицы частично стабилизированы полимером оболочки. Образовавшиеся в растворе наночастицы серебра также адсорбируются на слой полианиона. Однако, частицы в растворе не стабилизированы, они легко агрегируют и связываются с поверхностью частиц в виде агрегатов. Размер этих агрегатов составляет 150 нм. В случае, когда на частицы CaCO_3 нанесен слой поликатиона, ионы серебра не адсорбируются на одноименно заряженную поверхность, наночастицы образуются только в растворе, а затем в основном удаляются при промывке.



а)

б)



в)

Рис. 15. СЭМ изображение микрочастиц карбоната кальция, покрытых одним полиэлектролитным слоем (а) ПСС и (б) ПАА с наночастицами серебра.

Для определения спектра поглощения полученных наночастиц серебра карбонат кальция был растворен, чтобы исключить вклад рассеяния микрочастицами карбоната кальция. Спектр поглощения оставшихся наночастиц серебра имеет широкую полосу в видимой области спектра (Рис. 16). Поэтому можно предположить, что при освещении лазерным излучением капсул с включенными наночастицами серебра они будут эффективно поглощать это излучение.

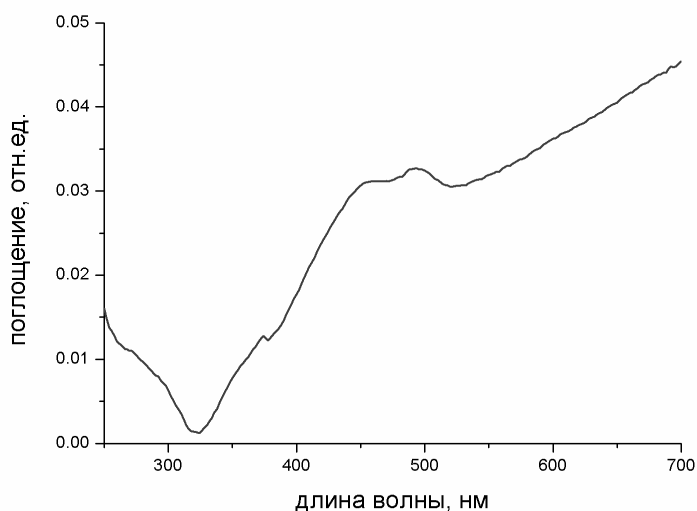


Рис 16. Спектр поглощения наночастиц серебра.

Формирование наночастиц серебра на полиэлектролитных капсулах.

Предложенный механизм получения наночастиц серебра был применен при создании полых нанокомпозитных капсул. Были получены полиэлектролитные капсулы с использованием в качестве ядер микрочастиц карбоната кальция со средним размером 4.5 мкм и полистирола с размером 4.4 мкм. Сформированные на частицах карбоната кальция оболочки состава (ПАА/ПСС)₄ и на частицах ПС – состава (ПАА/ПСС)₈ после растворения ядер представляют собой устойчивые сферические капсулы, диаметр которых в водной суспензии соответствует диаметру ядра. С помощью реакции серебряного зеркала на оболочках капсул, полученных на ядрах полистирола, были созданы наночастицы серебра, размер которых составляет 160±60 нм (Рис. 17).

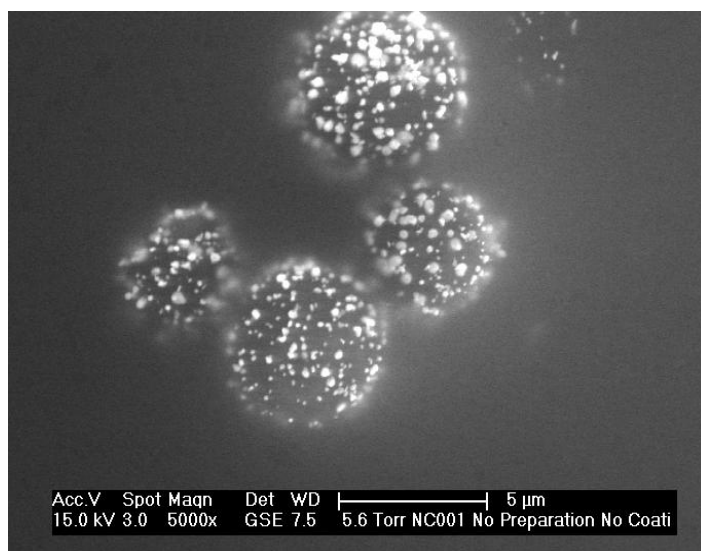


Рис. 17. Изображение полиэлектролитных капсул с наночастицами серебра в оболочке, полученное методом сканирующей электронной микроскопии (образец 11).

Из ПЭМ изображений капсул видно, что в случае формирования нанокomпозитных капсул на ядрах CaCO_3 (Рис. 18), образовавшиеся наночастицы серебра располагаются по направлению каналов пор микросферолитов ядер. При этом размер отдельных наночастиц составляет 50 ± 20 нм. Это объясняется тем, что микросферолиты CaCO_3 имеют поры диаметром 20-70 нм [28], основная часть поверхности ядер и полиэлектролитной оболочки приходится на поры, соответственно адсорбция ионов серебра и образовавшихся в растворе наночастиц происходит в основном в объемах пор и размер полученных наночастиц серебра ограничен размером пор. На полистирольных ядрах получается гладкая оболочка. Благодаря этому образование и адсорбция из раствора наночастиц серебра происходит на поверхности оболочки.

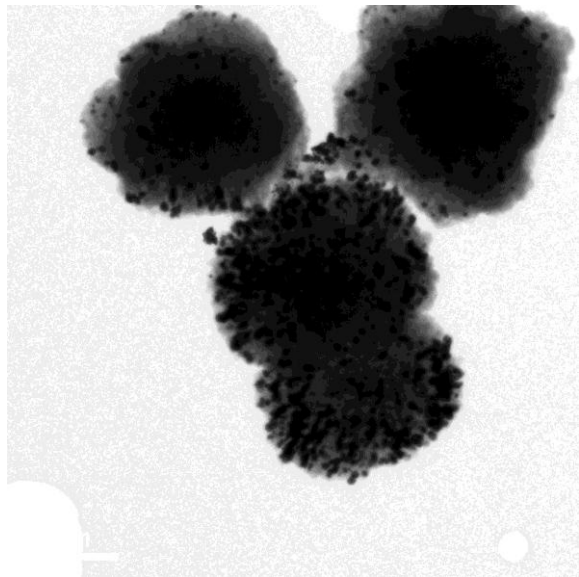


Рис. 18. ПЭМ изображение полиэлектролитных капсул, сформированных с использованием CaCO_3 ядер (образец № 16), с наночастицами серебра, полученными реакцией серебряного зеркала.

Было изучено влияние условий протекания реакции серебряного зеркала на параметры полученных наночастиц. В литературе отмечено, что влияние

температуры на образование наночастиц является неоднозначным [94]. Увеличение температуры, с одной стороны, способствует ускорению реакции синтеза кристаллизующихся частиц, а с другой - уменьшает вероятность ассоциации частиц в кластеры вследствие возрастания тенденции к беспорядку. В то же время ассоциация в кластеры облегчается из-за роста диффузионной подвижности частиц. На полиэлектролитных капсулах, полученных на ядрах полистирола, при проведении реакции серебряного зеркала при температуре 50°C размер частиц достигает 500-700 нм, т.е. ускоряется рост частиц и/или их ассоциация в кластеры. Таким большим частицам сложно удержаться на поверхности капсулы, и происходит их десорбция с оболочки.

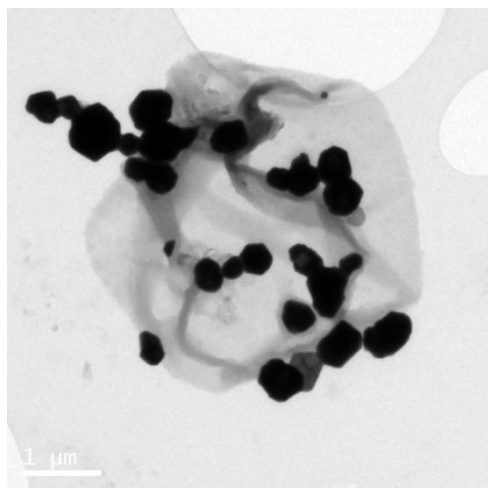


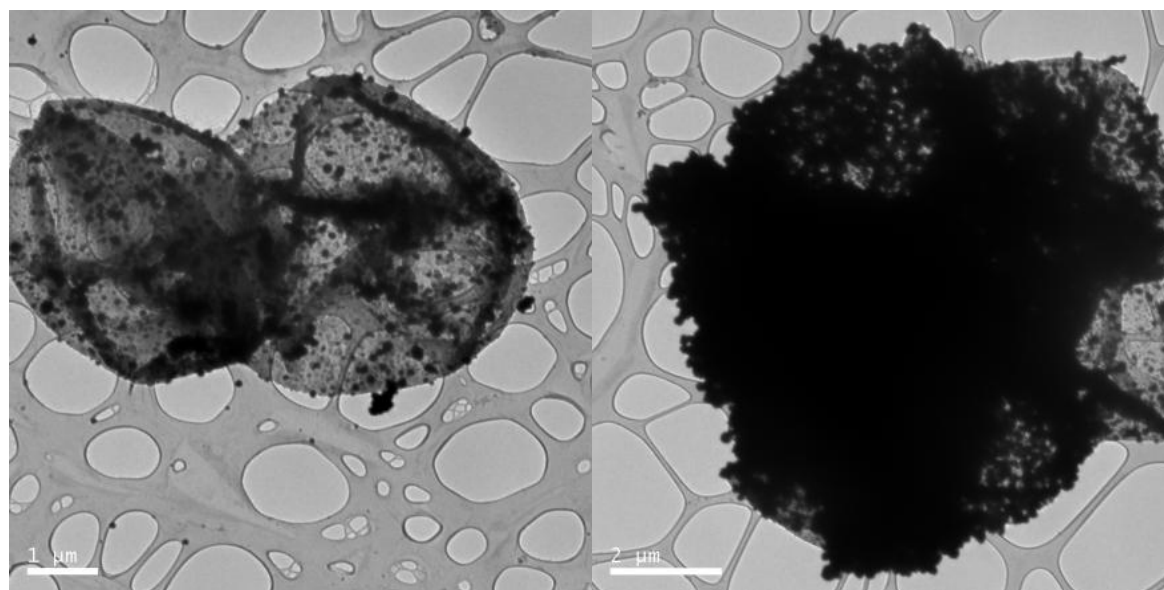
Рис. 19. ПЭМ изображение нанокompозитной капсулы, сформированной с использованием реакции серебряного зеркала при температуре 50°C (образец № 10).

В отличие от капсул, сформированных на ядрах полистирола, в случае ядер карбоната кальция изменение температуры с 20 до 50 °C (образцы № 14, 15) не приводит к существенному изменению системы. Это обусловлено тем, что размер наночастиц ограничен размером пор микросферолитов CaCO₃. После растворения ядра оболочка представляет собой пористую «губку» из полимеров, которая со всех сторон окружает наночастицы серебра, стабилизируя их поверхность.

Предполагалось, что более интенсивное перемешивание ультразвуком будет способствовать преобладанию зародышеобразования над ростом частиц. Это должно привести к образованию большего количества мелких частиц, чем в

образцах без использования ультразвука. Однако в результате УЗ-обработки на поверхности капсул, полученных на полистирольных ядрах, наблюдалось существенно меньшее количества практически таких же по размеру наночастиц, как в случае, когда реакция проходит без использования ультразвука. По-видимому, перемешивание в ультразвуковой ванне не влияет существенным образом на образование и рост наночастиц, а лишь способствует десорбции наночастиц с оболочки.

При увеличении времени прохождения реакции серебряного зеркала на капсулах, сформированных на ядрах полистирола (образцы № 1-3, 4-6), наблюдалось увеличение количества наночастиц серебра (Рис. 20). При проведении реакции в течение 60 мин оболочка капсулы практически полностью покрывалась слоем наночастиц. Большое количество образовавшихся наночастиц серебра в составе оболочки существенно снижает проницаемость капсул, что может привести к невозможности полного растворения ядра.



7 мин.

60 мин.

Рис. 20. Влияние времени протекания реакции серебряного зеркала на образование наночастиц серебра в оболочке полиэлектролитных капсул.

Результаты воздействия лазерного излучения на капсулы с наночастицами серебра в оболочке. Полученные нанокомпозитные капсулы подвергали воздействию лазера с длиной волны 532 нм, которая лежит в полосе поглощения

наночастиц серебра, и мощностью 100 мВт в течение 15 с. Наблюдалось полное разрушение капсул под действием этого излучения. (Рис. 21).

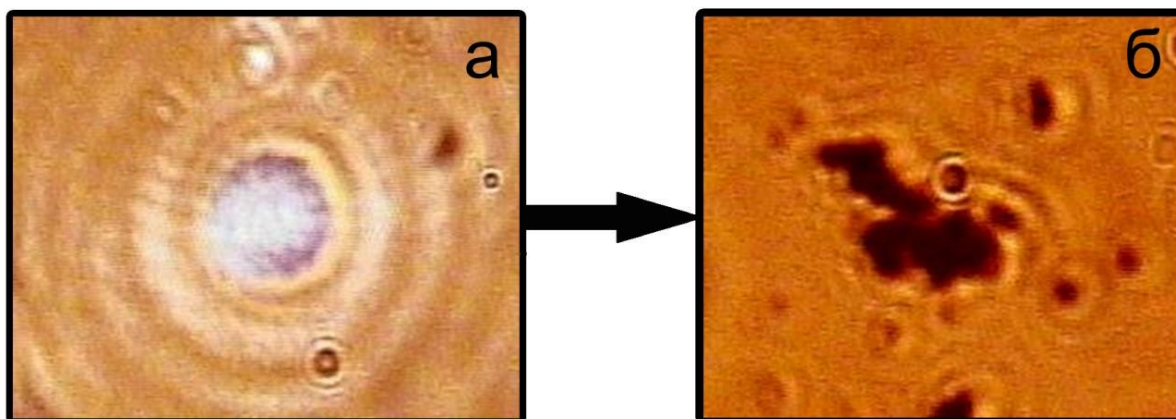


Рис. 21. Воздействие лазера на полиэлектролитные капсулы с наночастицами серебра в оболочке. Фотография капсулы: сразу после помещения в лазерный пучок (а), при выдержке 15 с под лазерным пучком (б).

3.2 Капсулирование красителей

Для создания сенсорных систем важно понимать процессы, происходящие с красителем внутри капсул. Для исследования влияния заряда красителя на возможность того или иного способа капсулирования были закапсулированы цианиновые красители, обладающие разными зарядами: нейтральный перилен, отрицательно заряженный краситель I и положительно заряженный краситель II.

Капсулы с красителями, закапсулированными методом адсорбции на ядрах.

Первый метод капсулирования красителей заключался в их адсорбции на CaCO_3 частицы с последующим покрытием ядер полиэлектролитными слоями. Изображения, полученные методом конфокальной флуоресцентной микроскопии, показывают, что краситель I и перилен адсорбировались на CaCO_3 ядра. На Рис. 22 показаны изображения микрочастиц CaCO_3 после адсорбции красителя и капсулы после нанесения оболочки и растворения CaCO_3 , содержащие краситель. Изображения в оптическом микроскопе таких же капсул с периленом показаны на рис. 23.

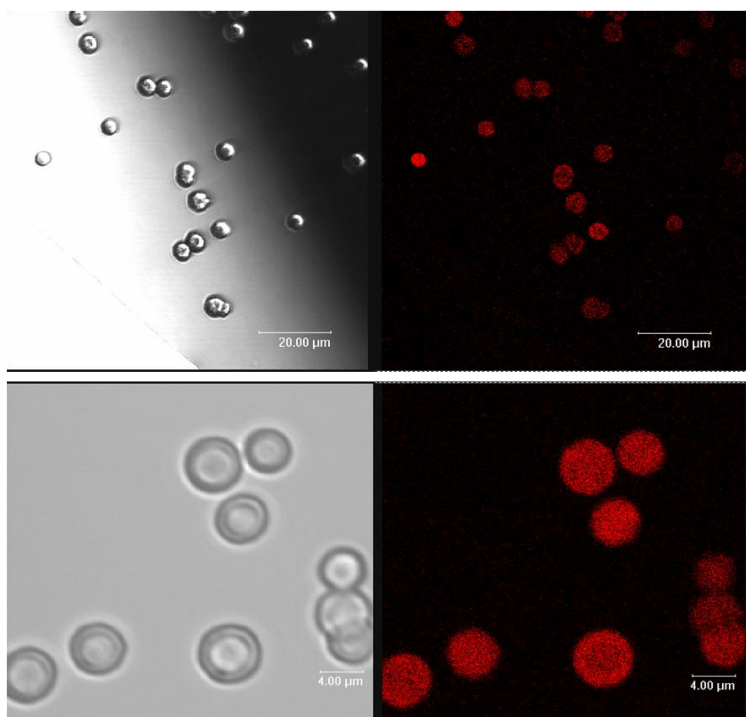


Рис. 22. Изображения микрочастиц CaCO_3 после адсорбции красителя I и капсулы, содержащие краситель (конфокальная флуоресцентная микроскопия)

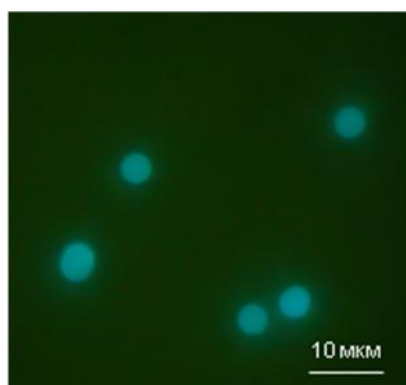


Рис. 23. Изображение капсул с периленом (оптическом микроскоп, флуоресцентный режим)

Таким образом, метод адсорбции на ядрах эффективен для капсулирования красителя I и перилена.

Капсулы с красителями, закапсулированными с помощью замены растворителя. Второй метод капсулирования заключался в осаждении красителя внутри капсулы при замене растворителя из-за разницы в растворимости красителя в спирте и воде. Краситель I растворим в этаноле. Известно, что при замене этанола на воду он образует нерастворимые агрегаты. Краситель II и перилен хуже

растворимы в воде, чем в этаноле. Поэтому мы предположили, что после замены растворителя красители будут оставаться внутри полиэлектролитных капсул.

По сути, такой метод капсулирования аналогичен первому, т.к. адсорбция красителей на ядра CaCO_3 проводится из спиртового раствора, а при растворении ядра и после его растворения капсулы с красителем оказываются в водной среде.

Красители I, II, и перилен были успешно закапсулированы осаждением красителя после замена растворителя. Молекулы красителей остаются внутри капсулы из-за их плохой растворимости в воде. Изображения капсул, полученные методом конфокальной микроскопии, подтвердили наполнение капсул красителями (рис. 24). Эти изображения показывают, что концентрации красителя вблизи оболочки капсулы значительно больше, чем в центре капсулы. Это может быть объяснено взаимодействием молекул красителя с полимерами оболочки: электростатического взаимодействия ионизованных групп и гидрофобных и Ван-дер-Ваальсовских взаимодействий других частей молекул.

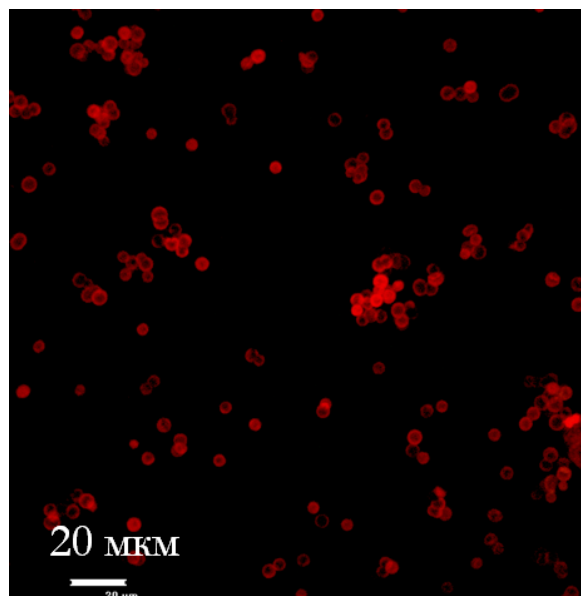


Рис. 24. Изображение капсул, содержащих краситель II (конфокальная флуоресцентная микроскопия)

Оптические свойства красителей в капсуле. Капсулы с красителями были исследованы методами оптической спектроскопии. Спектр поглощения суспензии капсул, заполненных красителем I, содержит полосу при 650 нм (рис. 25), которая соответствует J-агрегатам молекул красителя [95]. Спектры поглощения капсул с

красителем II и периленом, напротив, имеют те же пики, что и раствор красителя в воде (554 нм для красителя II, 415 и 438 нм для перилена). Это означает, что красители существуют в форме мономеров внутри капсулы и взаимодействие молекул красителя с полиэлектролитами существенно не изменяет их конформации.

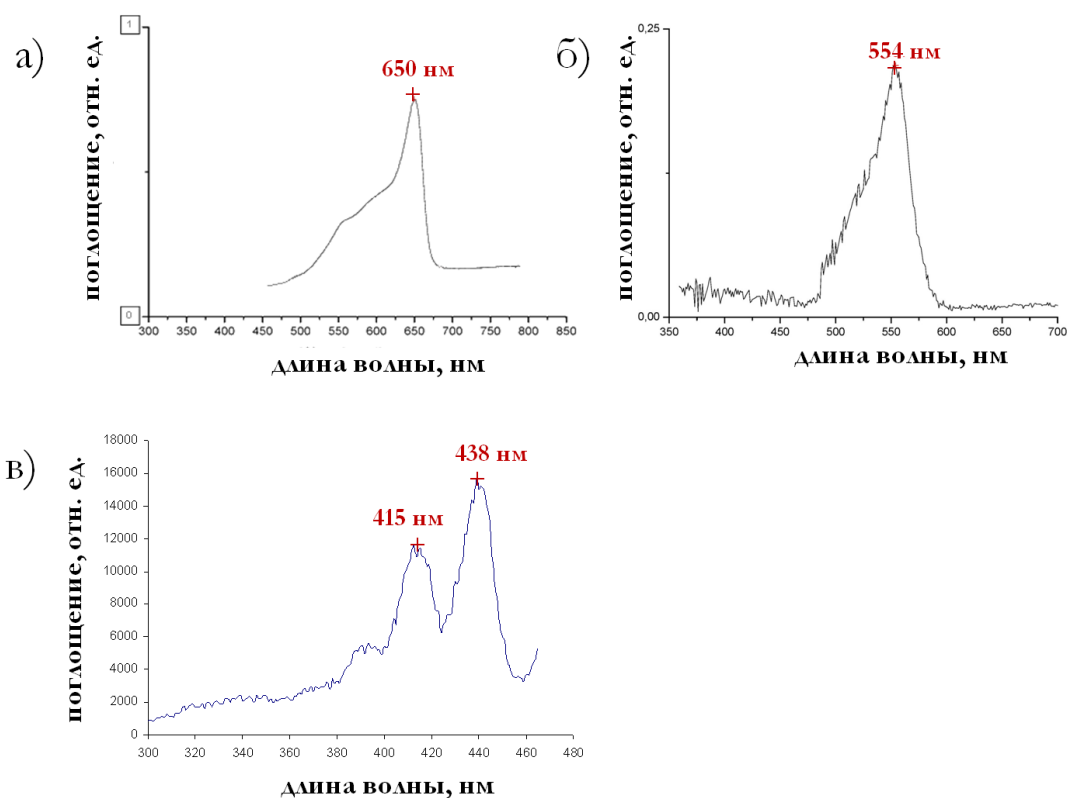


Рис. 25. Спектры поглощения красителей в капсулах: а) краситель I, б) краситель II, в) перилен

Изображения, полученные методом конфокальной лазерной микроскопии, показывают, что концентрация красителя I у стенок капсулы больше, чем в объеме капсул. Это можно объяснить тем, что отрицательно заряженный краситель электростатически взаимодействует с положительно заряженным ПАА. Было обнаружено, что распределение красителей внутри капсул различно для капсул, формируемых на CaCO_3 и полистирольных ядрах (рис. 26). В случае CaCO_3 ядра интенсивности флуоресценции постепенно спадает по направлению от стенок к середине капсулы, без четкой границы (рис. 26 а). Это может быть объяснено пористой структурой CaCO_3 . При образовании оболочки молекулы полимера адсорбируются в порах, это приводит к формированию рыхлой «губки» полимера

внутри капсулы после растворения ядра. Молекулы красителей проникают в эту губку. Полистирольные частицы имеют гладкую поверхность, поэтому полимеры адсорбируются на ней равномерно. В результате образуется тонкая и плотная полимерная оболочка. Молекулы красителя адсорбируются на внутренней стороне оболочки, поэтому видна резкая граница интенсивности флуоресценции (рис. 26 б).

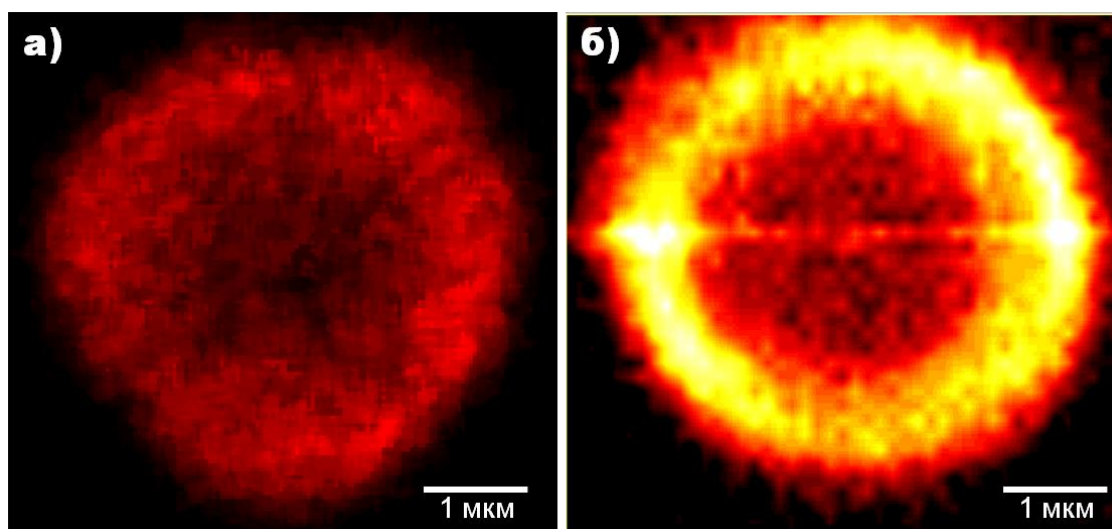


Рис. 26. Изображения капсул, заполненных красителем I, формируемых на CaCO_3 (а) и полистирольных (б) ядрах

Таким образом, были предложены различные методы капсулирования флуоресцентных красителей в полиэлектролитные капсулы. Для капсулирования плохо растворимых в воде красителей были успешно применены адсорбция на пористых ядрах и замена растворителя.

3.3 Полиэлектrolитные капсулы с включенными в оболочку молекулами красителей и их разрушение под действием лазерного излучения

3.3.1 Капсулы с родамином 6Ж. Были получены капсулы без красителя, состоящие из 8 слоев полиэлектролитов (ПДДА/ПСС)₄, и капсулы с включенным в оболочку родамином 6 Ж. Этот краситель имеет положительный заряд, поэтому он адсорбировался на поверхность полиэлектролитной оболочки капсул за счет электростатического взаимодействия с противоположно заряженными молекулами ПСС.

Изображения в конфокальном микроскопе показывают, что молекулы родамина 6Ж были успешно включены в оболочку капсул (Рис. 27). Спектры флуоресценции молекул родамина 6Ж, внедренных в оболочки капсул (Рис. 28), практически не отличались по форме от спектров монослоя молекул красителя, адсорбированного на нейтральной кварцевой подложке. Поскольку положение максимума в спектре флуоресценции и полуширина спектральных линий чувствительны к локальным зарядам в окружающей краситель матрице [55], такой характер спектров говорит о том, что при послойной адсорбции полиионов, образующих матрицу, происходит практически полная компенсация их зарядов, и структура оболочки капсул является довольно совершенной. Интенсивность флуоресценции от водной суспензии окрашенных капсул более чем на порядок ниже интенсивности флуоресценции от растворов красителей (при нормировании на одинаковую среднюю концентрацию молекул родамина 6Ж во взвеси окрашенных капсул и в растворе красителя). Резкое уменьшение интенсивности флуоресценции молекул красителя в оболочке капсул, говорит об эффективной диссипации энергии фотовозбужденных молекул окружающей органической матрицей, что реализуется при совпадении колебательных частот молекулы родамина 6Ж и образующих матрицу полиионов [58].

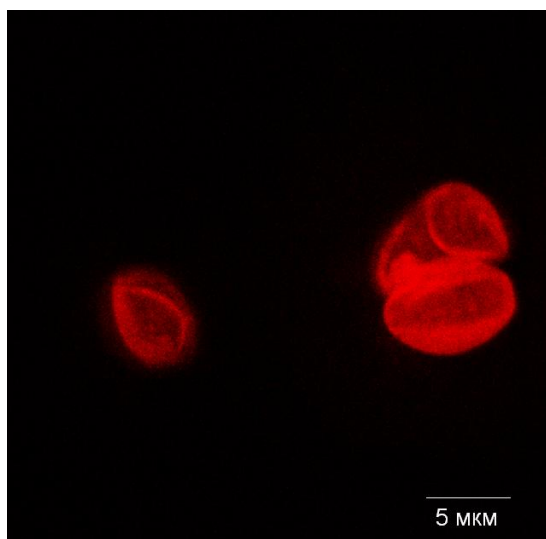


Рис. 27. Изображение полиэлектролитных капсул с включенным в оболочку родамином 6Ж (конфокальная флуоресцентная микроскопия)

Для определения интегральных характеристик суспензий окрашенных капсул (концентрации капсул в суспензии, распределения капсул во взвеси по размерам) эффективно использовать оптические методы. Интенсивность флуоресценции окрашенных капсул оказалась пропорциональной концентрации капсул в широком диапазоне ее изменения. Используя нормированные на определенную концентрацию спектры, можно быстро оценивать концентрацию капсул, причем в различных частях суспензии (рис. 28).

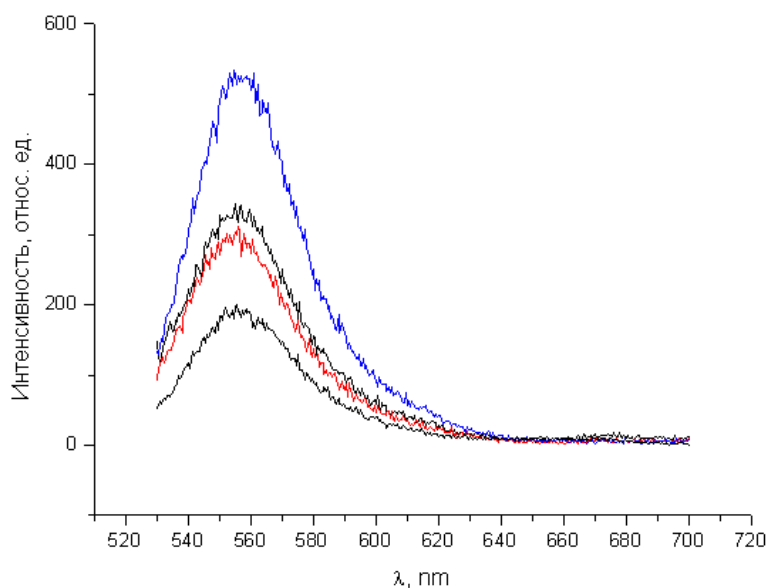


Рис 28. Спектры флуоресценции красителя, внедренного в оболочку, для разной концентрации капсул.

Методом корреляционной спектроскопии рассеянного света было определено распределение капсул по размерам. Обработка данных по рассеянию света неокрашенными и окрашенными капсулами позволила вычислить средние радиусы капсул, а также среднюю ширину распределения капсул по размерам на полувысоте кривой распределения. На Рис. 30 представлены зависимости распределения исследуемых микрокапсул по размерам. Из Рис. 30 видно, что для неокрашенных капсул средний радиус составлял 1700 нм, а ширина распределения - 600 нм (кривая 1), для окрашенных эти параметры составляли 2400 нм и 1500 нм (кривая 2).

Спектр поглощения капсул с родамином 6Ж в оболочке имеет пик поглощения на длине волны 540 нм (Рис. 29). Суспензию капсул облучали лазером с длиной волны 532 нм, близкой к пику поглощения капсул.

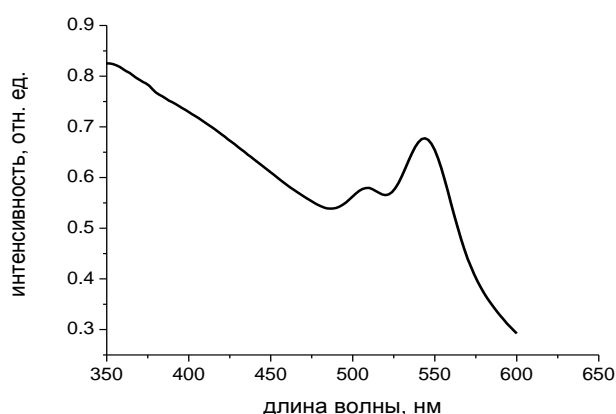


Рис. 29. Спектр поглощения капсул с родамином 6Ж в оболочке.

Облучение суспензий капсул интенсивным светом в полосе поглощения молекул красителя практически не влияло на характер рассеяния света неокрашенными капсулами, и кардинально его изменяло для капсул с внедренными в их оболочку молекулами красителя (Рис. 30, кривая 3). В последнем случае средний размер рассеивающих частиц взвеси составил 600 нм, а ширина распределения на полувысоте – 250 нм. Полученные результаты свидетельствуют о разрушении в результате проведенной лазерной обработки значительной части окрашенных капсул. На это также указывают прямые микроскопические наблюдения этих взвесей. Механизм такого разрушения может

быть обусловлен эффективным поглощением молекулами красителей падающего излучения и дальнейшим переносом энергии в окружающую молекулы матрицу, что возможно при совпадении колебательных мод молекулы и полимерных звеньев [58]. В этом случае происходит перенос колебательной энергии возбуждения по индуктивно–резонансному механизму, что приводит к локальному неравновесному нагреву ближайшего окружения молекул красителя и разрыву связей в оболочке капсулы.

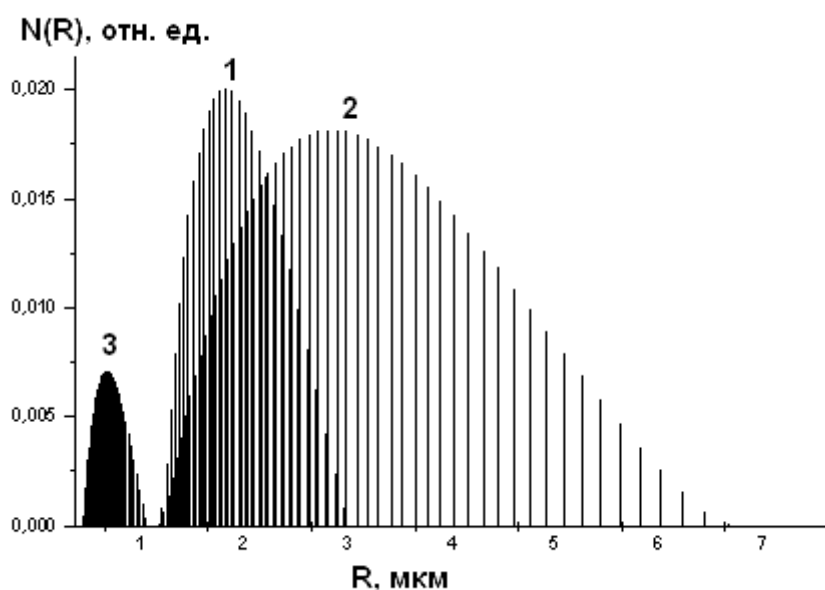


Рис. 30. Распределение числа капсул в зависимости от их радиуса, полученное методом корреляционной спектроскопии рассеянного света: 1 – капсулы без красителя, 2- капсулы с красителем в оболочке, 3 – капсулы с красителем в оболочке после облучения лазером.

3.3.2 Капсулы с флуоресцеин изотиоцианатом.

Флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ) был включен в оболочку капсул двумя способами: за счет включения в состав оболочки химически связанного с красителем полиаллиламина, и с помощью непосредственной адсорбции красителя на оболочку. В первом случае в качестве одного из слоев был включен слой ФИТЦ-ПАА и были получены капсулы с составом $(\text{ПАА/ПСС})_2$ ФИТЦ-ПАА/ПСС/ $(\text{ПАА/ПСС})_2$. Молекула ФИТЦ образует связь с аминогруппой ПАА.

Количество связанного красителя составляет примерно 1 молекулу красителя на 125 мономеров ПАА [96].

Во втором случае краситель был адсорбирован на поверхность оболочки. Так как ФИТЦ не имеет электрического заряда, то мы предположили, что он может адсорбироваться за счет межмолекулярных взаимодействий с полиэлектролитами оболочки, например, с образованием водородной связи между С=О группой молекулы флуоресцеин изотиоцианата и N–H группами молекулы ПАА [97]. Поэтому слой красителя был адсорбирован после слоя ПАА и в результате были получены капсулы с составом (ПАА/ПСС)₂/ПАА/ФИТЦ/ПСС/(ПАА/ПСС)₂. Изображения в конфокальном микроскопе показывают, что в обоих случаях ФИТЦ включается в оболочку капсул (наблюдается флуоресценция в диапазоне 500-700 нм, при возбуждении лазером с длиной волны 488 нм) (Рис. 31). Видно, что в случае адсорбции краситель находится не только в оболочке, но и проникает внутрь капсулы. Были измерены спектры поглощения капсул с красителем (Рис.32). Они показывают, что в случае адсорбции включается большее количество красителя. Положения пиков поглощения красителя в капсулах сдвинуты в длинноволновую область относительно пика поглощения водного раствора красителя, который составляет 475 нм. Для адсорбированных молекул ФИТЦ сдвиг максимума составлял 30 нм, для химически связанных до 42 нм.

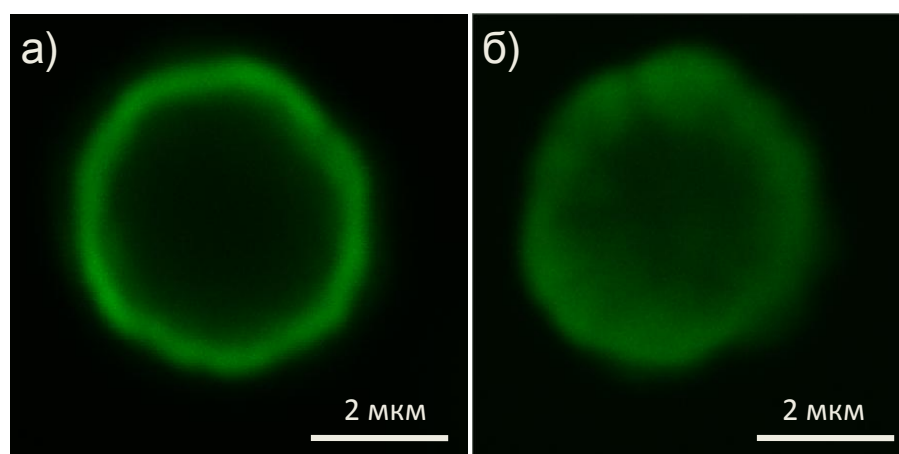


Рис. 31. Изображение в конфокальном микроскопе капсул с включенными в оболочку молекулами ФИТЦ: а) химически связанный краситель, б) адсорбированный краситель

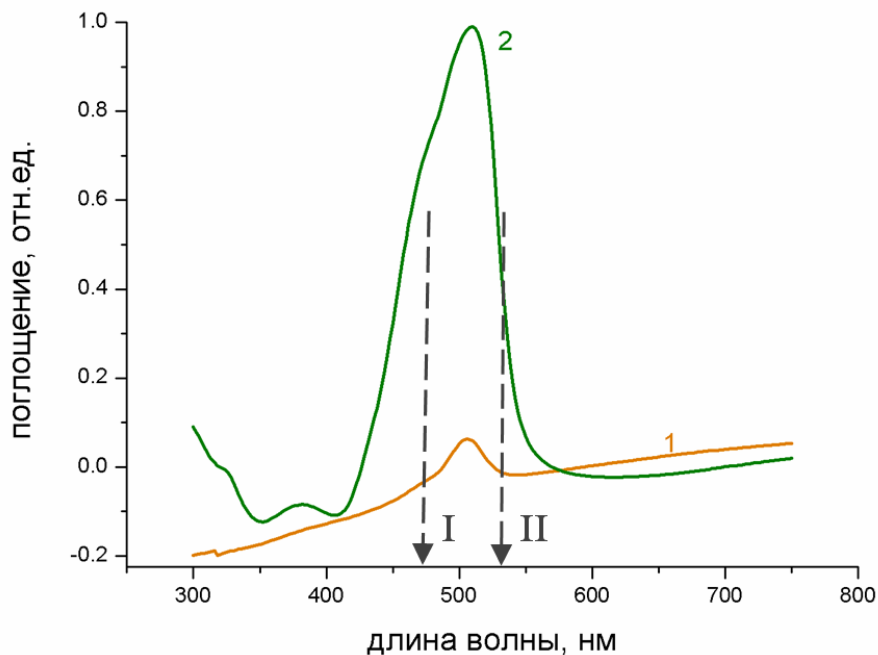


Рис. 32. Спектр поглощения капсул с ФИТЦ в оболочке (с вычитанием спектра поглощения капсул без красителя): 1 - химически связанный краситель, 2 - адсорбированный краситель. Стрелками показаны максимум поглощения ФИТЦ в водном растворе (I) и длина волны, на которой происходило облучение (II).

Суспензию капсул облучали лазером с длиной волны 532 нм, лежащей в полосе поглощения ФИТЦ. Методом корреляционной спектроскопии рассеянного света были получены распределения капсул по размерам до и после облучения лазером. Средний радиус капсул без красителя составлял 1 мкм (Рис. 33 а). После облучения лазером распределение не изменилось (Рис. 33 б), то есть используемое лазерное излучение не оказывает влияния на капсулы, не содержащие краситель.

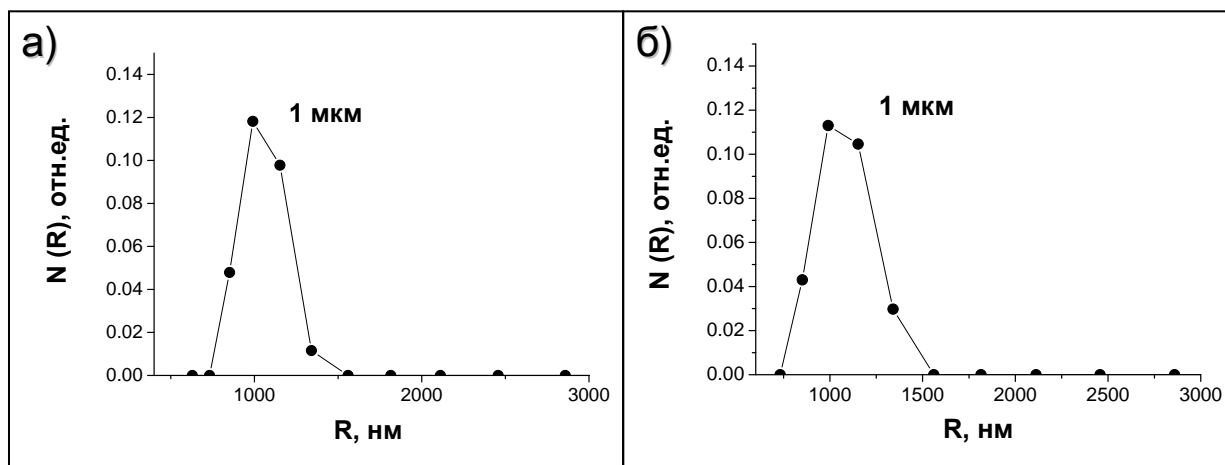


Рис. 33. Распределение по размерам капсул без красителя до (а) и после (б) облучения лазером.

Для капсул с химически связанным красителем средний радиус составлял 1.4 мкм (Рис. 34 а). После облучения он практически не изменился (Рис. 34 б). Таким образом, капсулы с химически связанным красителем не подвергаются разрушению под действием используемого лазерного излучения.

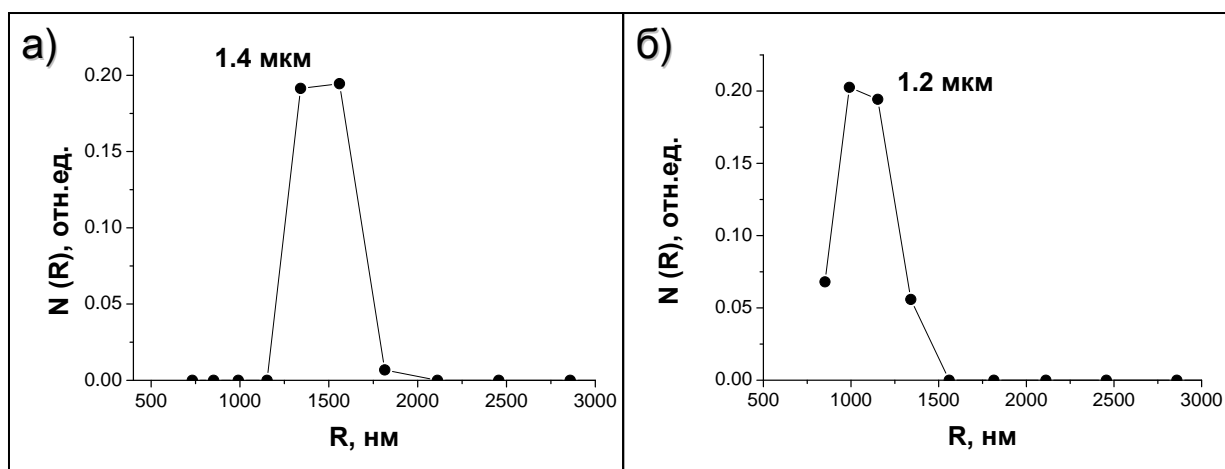


Рис. 34. Распределение по размерам капсул с химически связанным красителем до (а) и после (б) облучения лазером.

Для капсул с адсорбированным красителем первоначальный средний радиус капсул составлял 1.9 мкм (Рис. 35 а). Видно, что облучение лазером повлияло на распределение капсул по размерам: пик при 1.9 мкм исчез, а возник пик при 370 нм (Рис. 35 б). Можно сделать вывод о том, что происходит разрушение капсул.

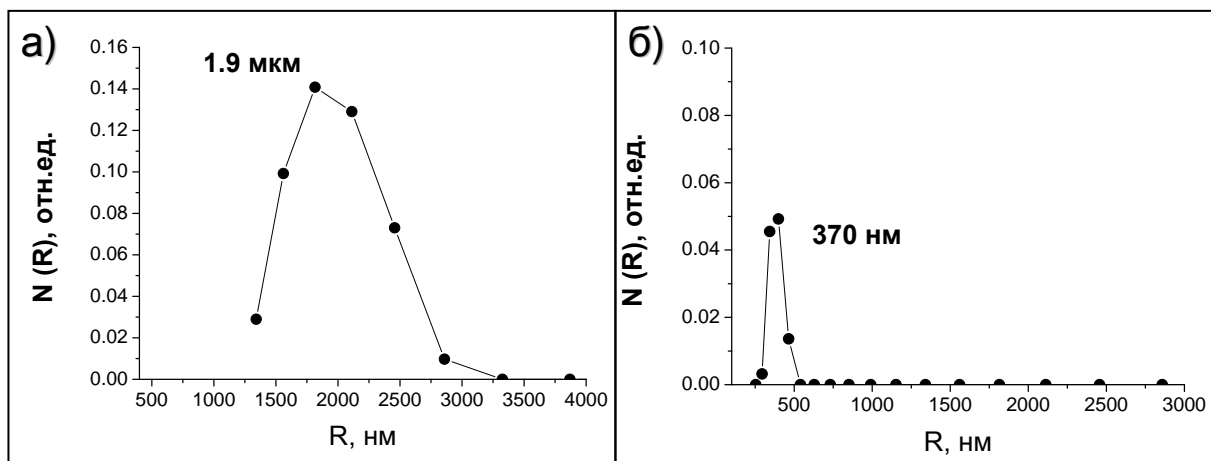


Рис. 35. Распределение по размерам капсул с адсорбированным красителем до (а) и после (б) облучения лазером.

В распределениях капсул по размерам для всех исследуемых образцов присутствуют два пика. Второй пик связан с агрегатами капсул. Для капсул с адсорбированным красителем в суспензии присутствовали агрегаты капсул со средним размером около 500 мкм (Рис. 36 а). Облучение лазером повлияло не только на распределение капсул по размерам, но и на средние размеры агрегатов - после облучения их размер составил 12 мкм. Можно сделать вывод о том, что происходит разрушение капсул, а так же уменьшение степени их агрегации (Рис. 36 б).

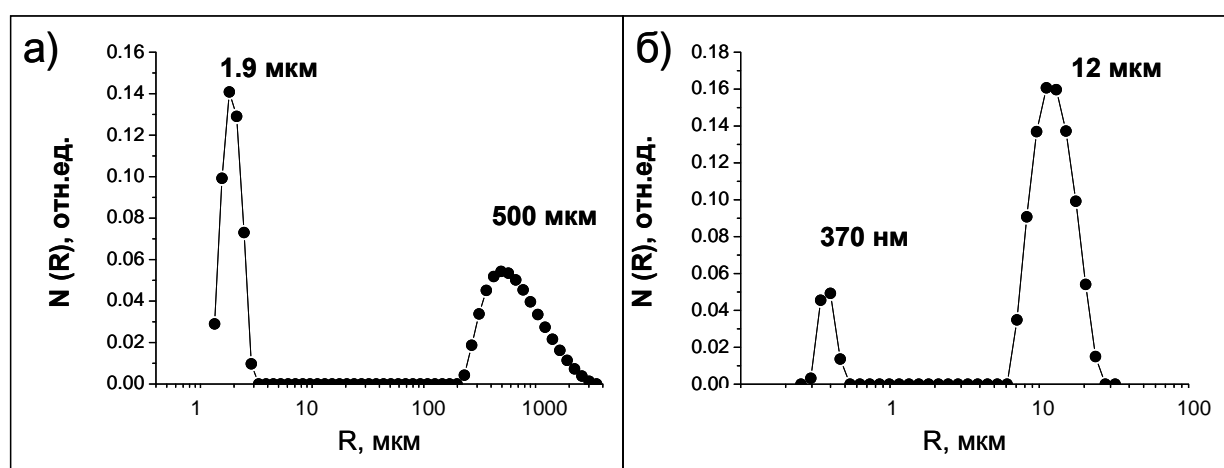


Рис. 36. Распределение по размерам капсул с адсорбированным красителем до (а) и после (б) облучения лазером.

В следующем эксперименте были исследованы распределения капсул по размерам как функция времени, прошедшего после воздействия лазера. Как и в предыдущем случае, исследовали капсулы без красителя и капсулы, содержащие ФИТЦ, включенный двумя способами в оболочку.

После облучения средний радиус капсул без красителя уменьшился незначительно и составил 700 нм. (Рис. 37 а). Далее был измерен средний радиус капсул через разные промежутки времени после облучения. Было обнаружено, что через 7 минут он достиг значения 800 нм (Рис. 37 б).

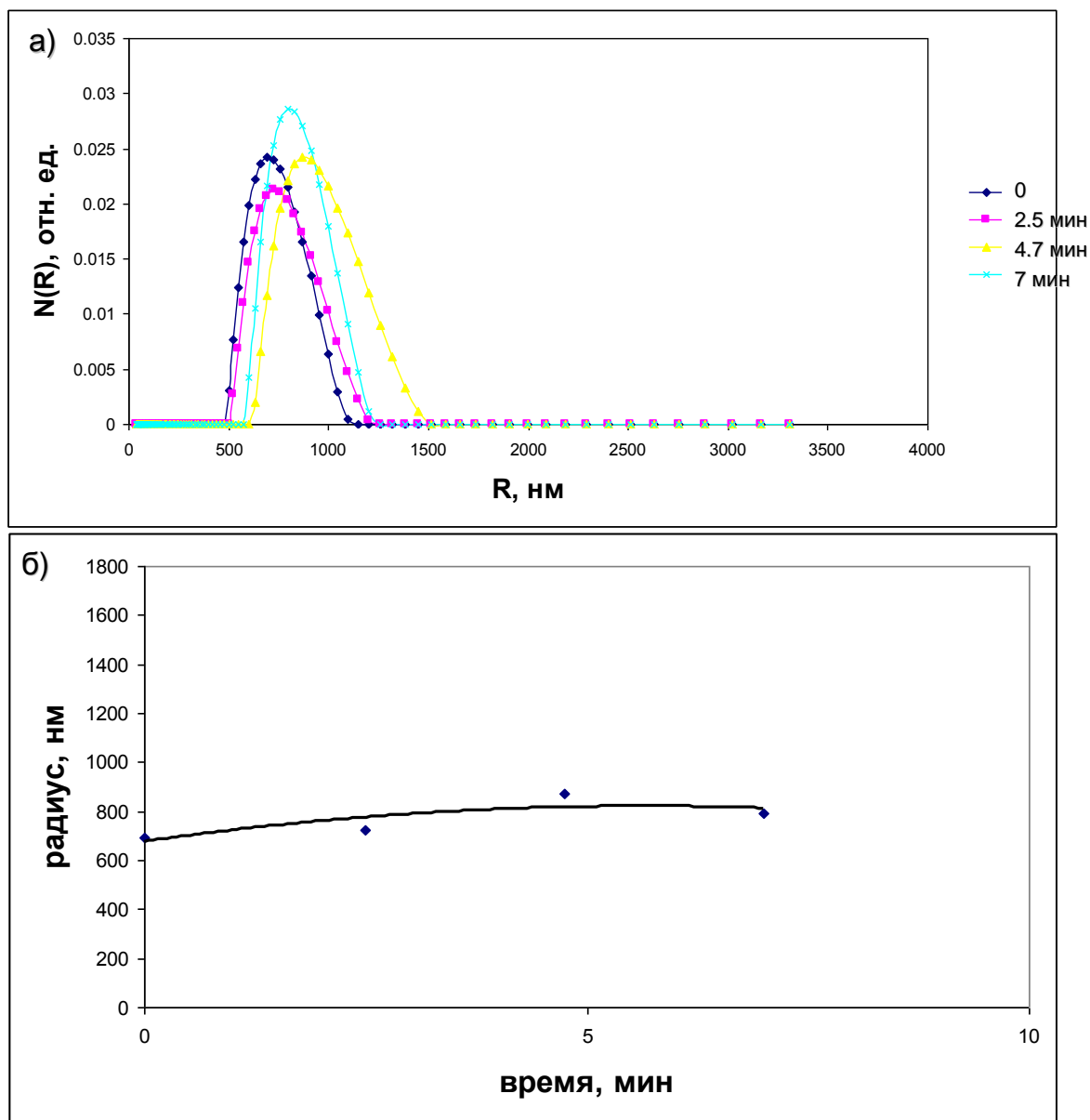


Рис. 37. Распределение по размерам капсул без красителя через различное время, прошедшее после облучения лазером (а). Зависимость радиуса капсул от времени, прошедшего после облучения (б).

Средний радиус капсул с одним слоем химически связанного красителя до облучения составлял 1.2 мкм, а ширина распределения по размерам на половине высоты - 200 нм (Рис. 38 а). Сразу после облучения средний радиус составлял 1 мкм, затем наблюдалось постепенное увеличение размера и через минут средний радиус достиг значения 1,3 мкм, ширина распределения по размерам составляла 300 нм. (Рис. 38 б,в). Распределения по размерам капсул с двумя слоями химически связанного красителя после воздействия лазера существенно не отличались от случая одного слоя.

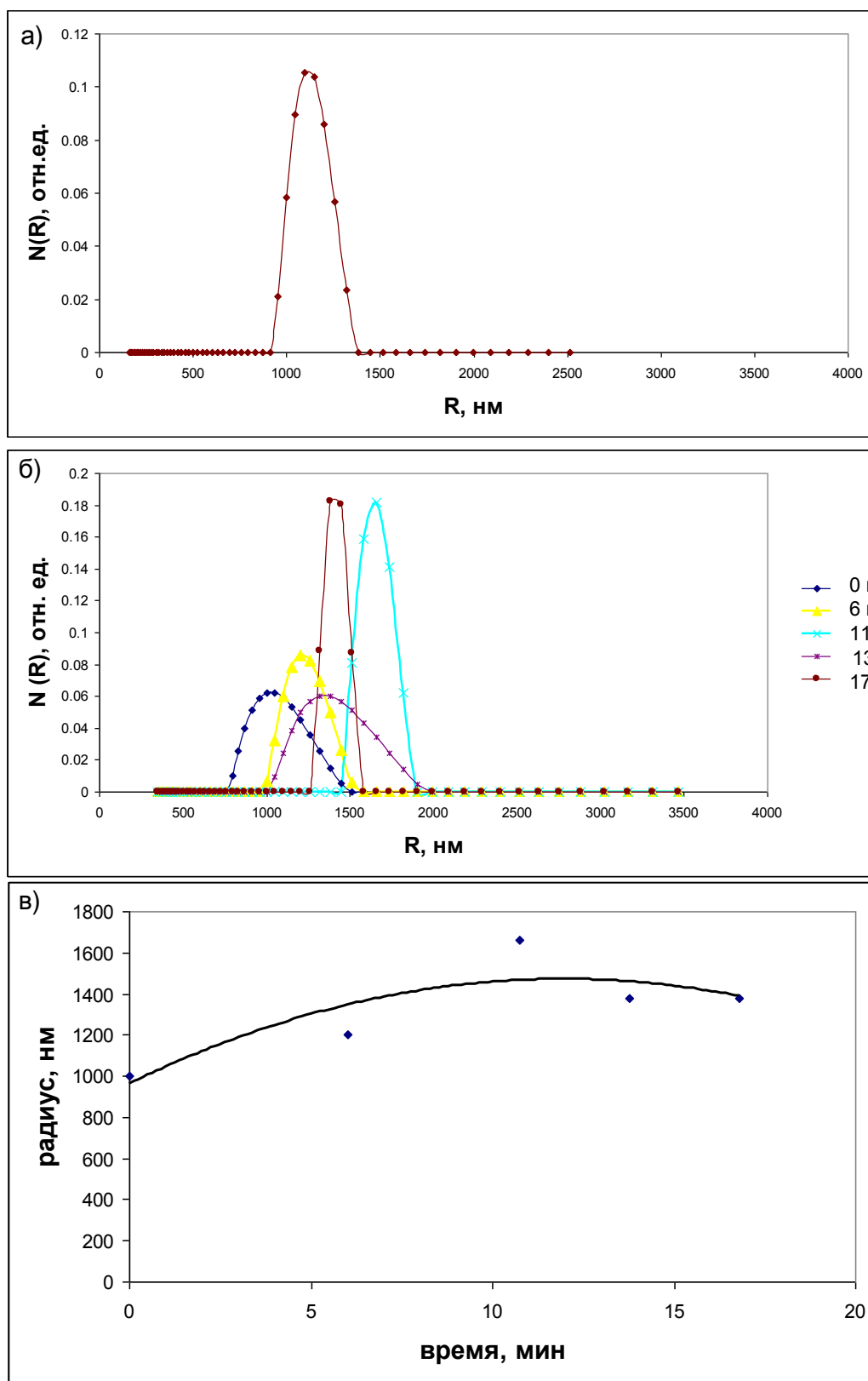
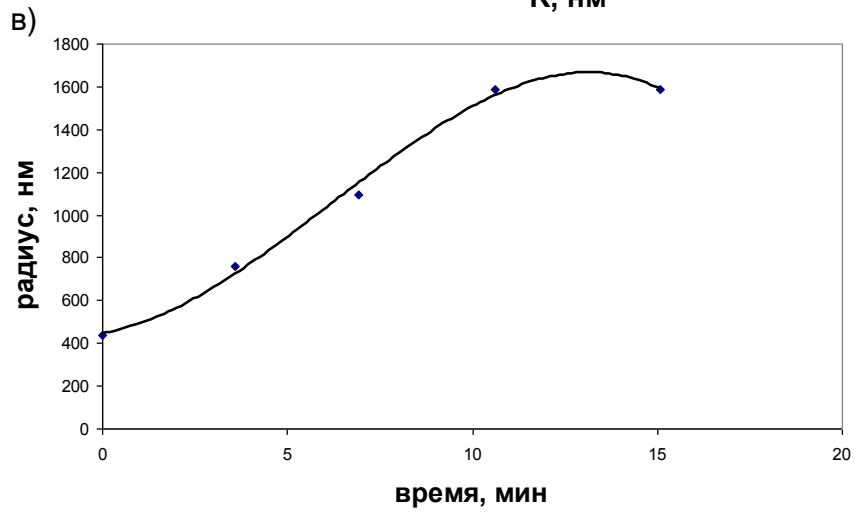
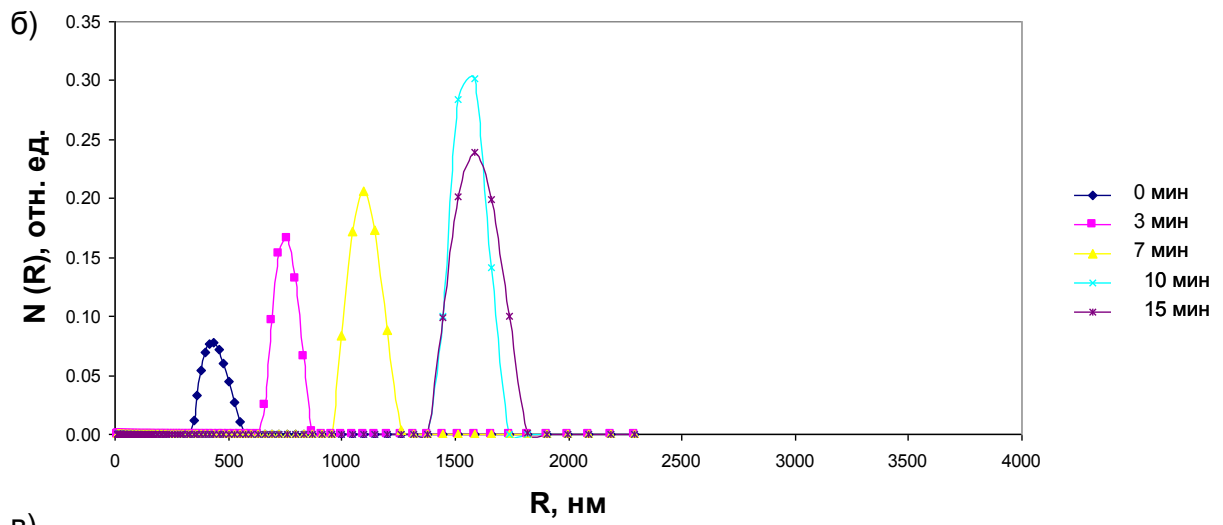
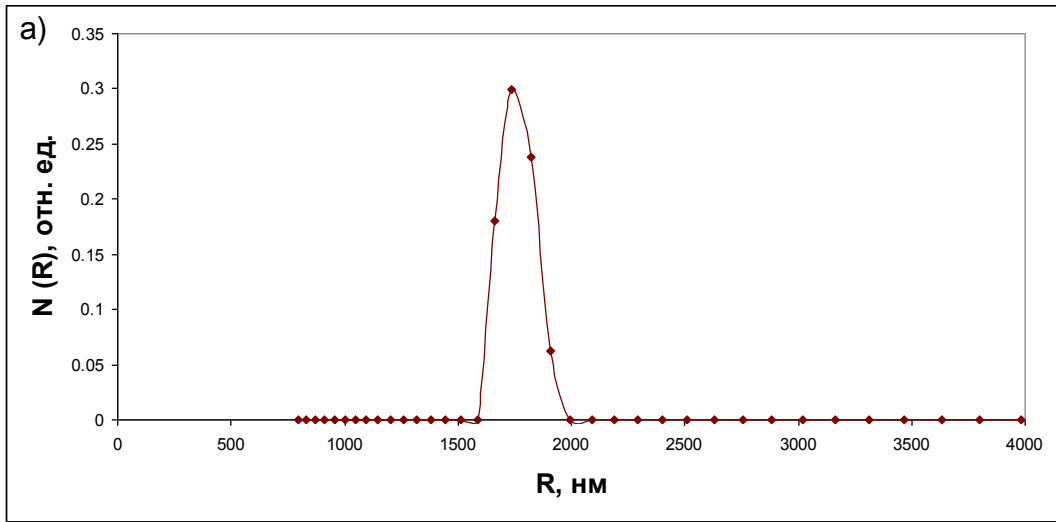


Рис. 38. Распределение по размерам капсул с химически связанным красителем до (а) и через различное время, прошедшего после облучения лазером (б). Зависимость радиуса капсул от времени, прошедшего после облучения (в).

Средний радиус капсул с адсорбированным красителем до облучения составлял 1.7 мкм, ширина распределения по размерам составляла 200 нм. Сразу после облучения средний размер изменился более существенно, чем в предыдущих случаях, и составил 0.5 мкм, а ширина распределения по размерам составила 100 нм (Рис 39 а). Далее был измерен средний радиус капсул в течение 15 минут после облучения (Рис 39 б,в). Было обнаружено, что радиус капсул возрастает со временем и через 15 минут он достигает первоначального значения 1.7 мкм. Затем было проведено повторное облучение того же образца лазером и измерены распределения по размерам сразу после облучения и в течение 35 минут после облучения. В этом случае сразу после облучения размер составил 500 нм, а затем вернулся к первоначальному 1.7 мкм. Ширина распределения по размерам составляла 300 нм (Рис 39 г,д).



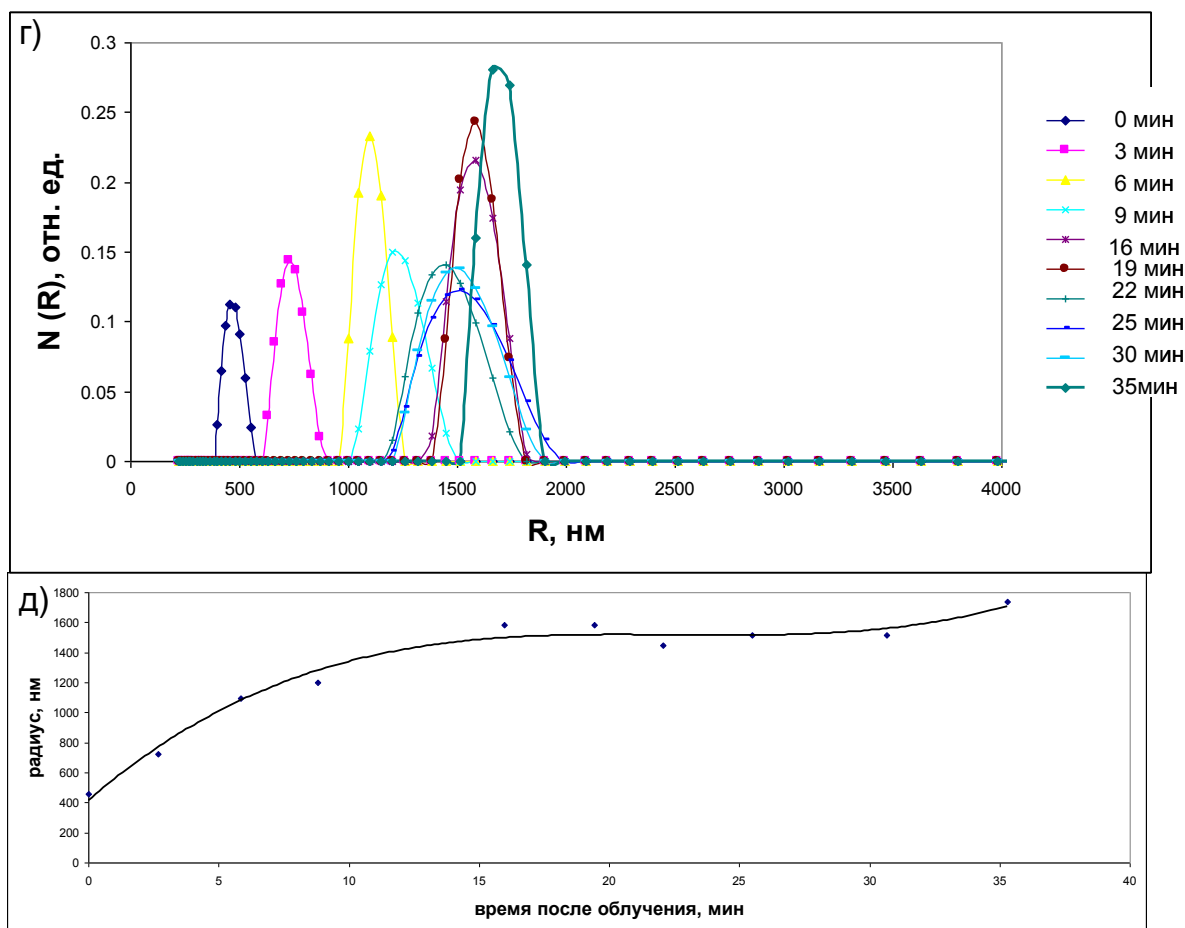


Рис. 39. Распределение по размерам капсул с адсорбированным красителем до (а) и через различное время, прошедшего после облучения лазером (б). Зависимость радиуса капсул от времени, прошедшего после облучения (в). Распределение по размерам капсул через различное время, прошедшее после повторного облучения лазером (г). Зависимость радиуса капсул от времени, прошедшего после повторного облучения (д).

Таким образом, как и в предыдущем эксперименте, было обнаружено, что облучение лазером не оказывает значительного влияния на капсулы без красителя и капсулы, содержащие химически связанный краситель. В случае, когда капсулы содержали в оболочке адсорбированный краситель, происходит существенное изменение размера частиц, что, по-видимому, связано с разрушением капсул. Затем происходит возвращение размеров частиц к первоначальному значению. Это может быть связано с агломерацией осколков.

3.3.3 Исследование зависимости размера капсул от температуры.

Для того, чтобы проверить, не связано ли уменьшение размеров капсул при лазерном облучении с нагреванием системы, была исследована зависимость размеров капсул от температуры. При нагревании суспензий окрашенных капсул (адсорбированный краситель) до температуры 50°C наблюдалось уменьшение среднего радиуса капсул с 2 до 0.7 мкм (Рис. 40). Это уменьшение являлось необратимым.

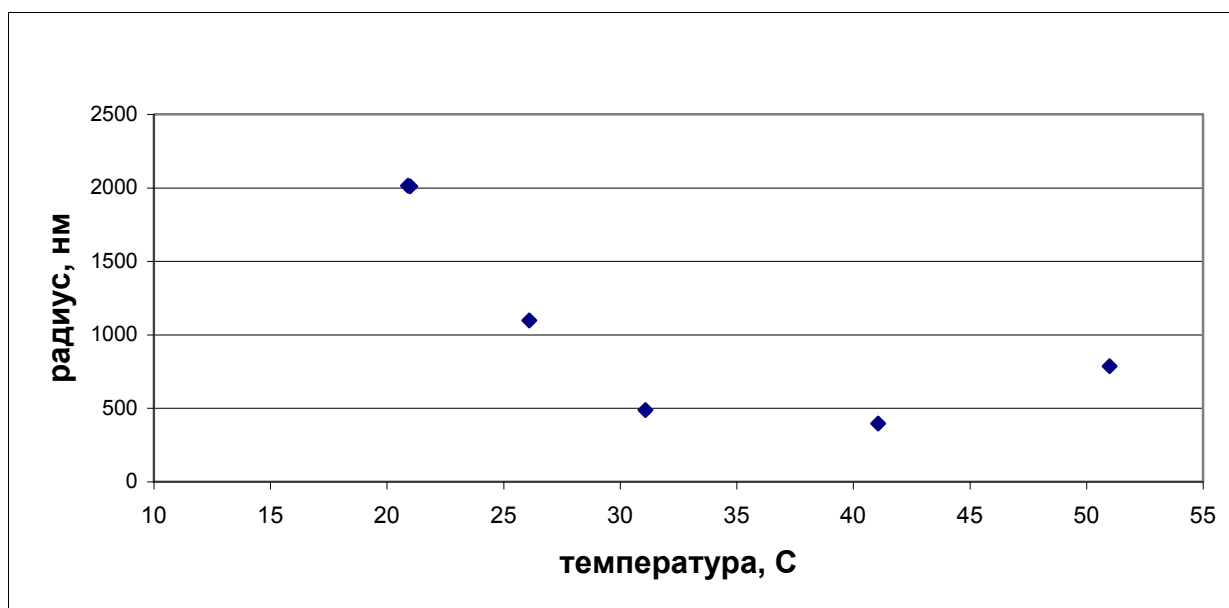


Рис. 40. Зависимость радиуса капсул с адсорбированным красителем от температуры

Некоторое уменьшение размеров капсул при нагревании суспензии капсул наблюдалось ранее [98]. При нагревании до температуры 50°C наблюдалось уменьшение в 5 раз размеров капсул, состоящих из ПДДА и ПСС, полученных на ядрах оксида кремния. Изменение размеров капсул при нагревании является необратимым эффектом [99]. Изменение размера объясняется тем, что благодаря тепловой энергии электростатическое притяжение между противоположно заряженными группами полиэлектролита преодолевается, приводя к взаимному проникновению полиионов и заживлению пустот [100]. В нашем случае изменение размера было меньшим, чем в [100] (приблизительно в 3 раза). По-видимому, это связано с тем, что в случае капсул, полученных на пористых ядрах из карбоната

кальция, в отличие от гладких ядер оксида кремния, внутри капсулы остается «губка» из полиэлектролитов, которая препятствует температурной усадке капсулы.

Для капсул без красителя наблюдалось незначительное уменьшение среднего размера после облучения лазером, которое имело необратимый характер. По-видимому, оно обусловлено некоторым нагревом суспензии капсул под действием лазера. В случае капсул, содержащих краситель, изменение размеров в результате лазерного облучения было обратимым, следовательно, оно не связано с повышением температуры.

Таким образом, эффект резкого изменения относительного размера капсул с адсорбированными молекулами красителя в результате лазерного облучения и его отсутствие для капсул других типов, обусловлен именно воздействием лазера и не является следствием изменения температуры взвесей.

3.4 Выводы о разрушении лазером капсул, содержащих молекулы красителей

Таким образом, включение молекул красителей родамина 6Ж и ФИТЦ дает возможность разрушать оболочку капсул. Было обнаружено, что этот эффект наблюдается только в том случае, когда краситель адсорбирован на оболочке. Фотосенсибилизированное разрушение капсул при интенсивном облучении в полосе поглощения адсорбированных молекул красителя может быть обусловлено эффективной диссипацией энергии электронного возбуждения молекул по колебательным уровням молекулы, с последующим ее переносом в окружающую молекулу красителя полимерную матрицу. Такой перенос может происходить по индуктивно резонансному механизму и реализуется при совпадении отдельных полос в колебательных спектрах молекул красителя и молекул полимера [58], что в нашем случае и реализуется. Критический радиус переноса энергии в подобных молекулярных системах составляет до 5 нм. Если учесть, что адсорбированные молекулы красителя и их кластеры располагаются неравномерно внутри полимерных капсул, описанный выше процесс может приводить к неравновесному локальному нагреву полимерной матрицы, разрыву связей и в итоге к разрушению

капсул. Отсутствие эффекта разрушения капсул, в состав которых входят химически связанные молекулы ФИТЦ, может быть обусловлено следующими причинами: такие молекулы более равномерно распределены в слое полимера, о чем свидетельствуют их более узкие, по сравнению со спектрами адсорбированных молекул, спектры поглощения, происходит эффективная диссипация энергии фотовозбуждения по колебательным уровням модифицированным красителем молекулам полимера. В результате этого происходит быстрая термализация энергии фотовозбужденных молекул по всему объему капсулы и ее неоднородного нагрева и разрушения не происходит. Может также иметь значение и то, что линия лазерного возбуждения попадает на край более узкого спектра поглощения химически связанных молекул, что снижает эффективность их возбуждения.

Было обнаружено, что хотя капсулы разрушаются, через некоторое время происходит их восстановление. Можно предположить, что это не будет препятствовать высвобождению закапсулированного материала, так как полное восстановление происходит в среднем через 20 минут, и закапсулированное вещество успеет покинуть капсулу за это время.

Таким образом, внедрение молекул красителей в оболочки полиэлектролитных капсул в процессе их синтеза, с одной стороны, позволяет их визуализировать и использовать оптические методы для определении интегральных характеристик суспензий капсул, а с другой, увеличивая интенсивность светового воздействия, эффективно разрушать капсулы в локальной области, что важно при их использовании для транспорта лекарств и реагентов, заключенных внутри капсулы.

3.5 Многокомпонентные микрочастицы и капсулы

Были получены многокомпонентные частицы и полые многокомпонентные капсулы, сформированные из микрочастиц, покрытых полиэлектролитной оболочкой. Внешние частицы адсорбировали на внутренние за счет электростатического взаимодействия противоположно заряженных наружных полиэлектролитных слоев. Для визуализации частиц в конфокальном микроскопе в

оболочку включали полиэлектролиты, маркированные флуоресцентными красителями. Для применения многокомпонентных капсул в качестве внутриклеточных сенсоров важно контролируемым образом отделять части многокомпонентной капсулы. Такая капсула может быть поглощена клеткой, а затем отдельные капсулы могут распределиться по разным частям клетки. В данной работе для такого отделения было предложено расщеплять биоразлагаемую оболочку из полипептидов под действием фермента. В качестве фермента использовали проназу, представляющую собой смесь различных протеиназ, которые расщепляют пептидные связи между аминокислотами в молекулах белков и синтетических полипептидов. В результате воздействия фермента полипептиды, составляющие оболочку, распадаются на отдельные аминокислоты и оболочка разрушается. В результате составные части многокомпонентной капсулы отделяются друг от друга (Рис 41).

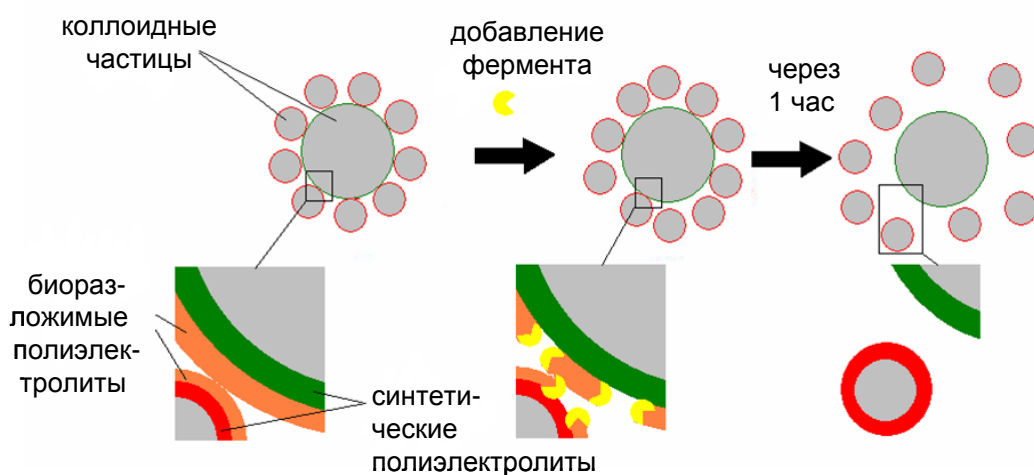


Рис. 41. Схема строения и разделения многокомпонентных частиц.

3.5.1 Получение многокомпонентных микрочастиц и капсул

Многокомпонентные микрочастицы и капсулы на основе ядер из карбоната кальция и полистирола. Для получения полых многокомпонентных капсул на ядрах из карбоната кальция была получена полиэлектролитная оболочка со структурой $(\text{ПАА}/\text{ПСС})_2/\text{ФИТЦ}-\text{ПАА}/(\text{ПСС}/\text{ПАА})_2$, а на полистирольных частицах $(\text{ПАА}/\text{ПСС})_3/\text{ТРИТЦ}-\text{ПАА}/\text{ПСС}/(\text{ПАА}/\text{ПСС})_2$. Затем внешние частицы адсорбировали на поверхность внутренних. В результате были получены многокомпонентные микрочастицы. Ядра частиц были растворены и в результате получены полые многокомпонентные капсулы (Рис. 42). Просвечивающие

изображения подтверждают, что ядра были растворены. Видно, что после растворения ядер внешние капсулы остаются на поверхности внутренних.

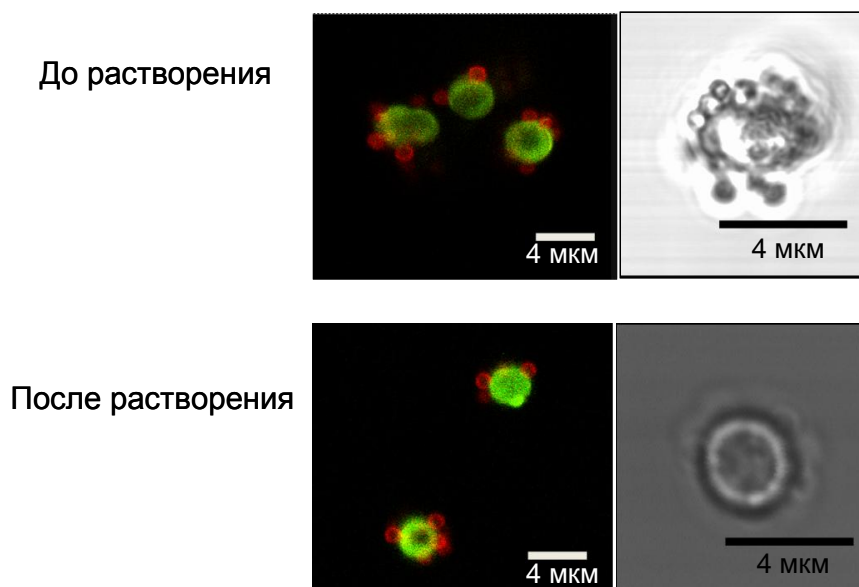


Рис. 42. Многокомпонентные микрочастицы и полые капсулы на основе ядер из карбоната кальция и полистирола.

Многокомпонентные микрочастицы на основе ядер из диоксида кремния.

Были сформированы многокомпонентные частицы на ядрах из диоксида кремния с полиэлектролитной оболочкой, внутренняя часть которой была образована из синтетических полиэлектролитов, а наружная – из биоразложимых полипептидов (Рис.). Вначале на внутренних частицах была получена оболочка со структурой $(\text{ПАА/ПСС})_2/\text{ФИТЦ-ПАА/ПСС}/\text{PArg}/\text{PAsp}/\text{PArg}$, а на внешних – $(\text{ПАА/ПСС})_2/\text{ПАА}/\text{ФИТЦ-декстран}/\text{PArg}/\text{PAsp}$. Внешние частицы адсорбировали на поверхность внутренних. Изображение полученной в результате многокомпонентной частицы, полученное методом сканирующей электронной микроскопии, показано на Рис. 43. Видно, что количество адсорбированных частиц на поверхности большой частицы больше, чем в случае CaCO_3 и полистирола (Рис. 42). По-видимому, это связано с меньшим размером частиц SiO_2 (0.58 мкм) по сравнению с полистирольными частицами (1 мкм).

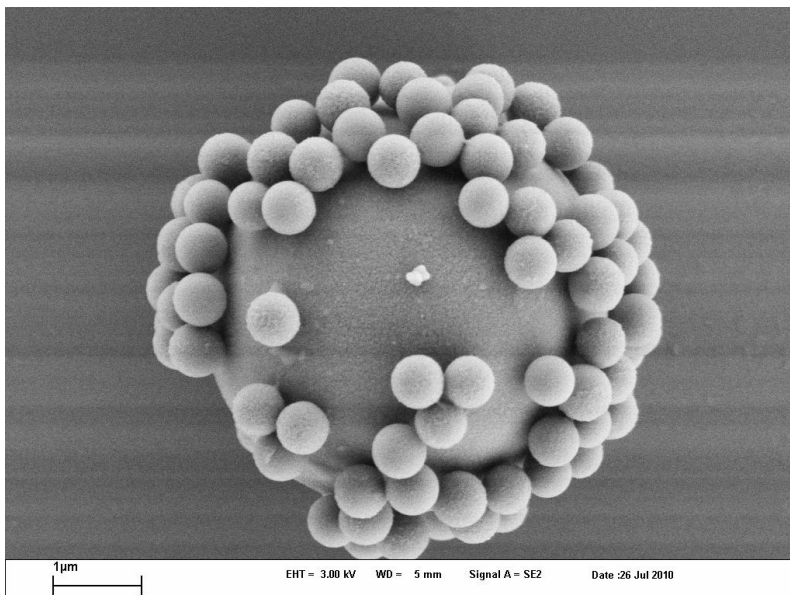


Рис. 43. Изображение в сканирующем электронном микроскопе многокомпонентной микрочастицы на основе ядер из диоксида кремния.

3.5.2 Разделение многокомпонентных частиц под действием проназы

Для разделения частиц их подвергали воздействию фермента. Наружные синтетические слои внешних и внутренних частиц (ФИТЦ-декстран и ПСС) имели одноименный заряд, поэтому мы предположили, что после расщепления внешней биоразлагаемой части оболочки внешние и внутренние частицы смогут отделиться друг от друга благодаря электростатическому отталкиванию. Изображения в конфокальном микроскопе показывают, что постепенно происходит отделение внешних микрочастиц от поверхности внутренних (Рис 44). Полное отделение внешних частиц от внутренних наблюдалось через 30 мин. инкубации (Рис. 44). Для подтверждения того, что отделение происходит из-за воздействия фермента, эти частицы перемешивали без проназы при 37°C, а также многокомпонентные частицы с оболочкой только из синтетических полимеров инкубировали в растворе проназы. В обоих случаях внешние частицы остались на поверхности внутренних.

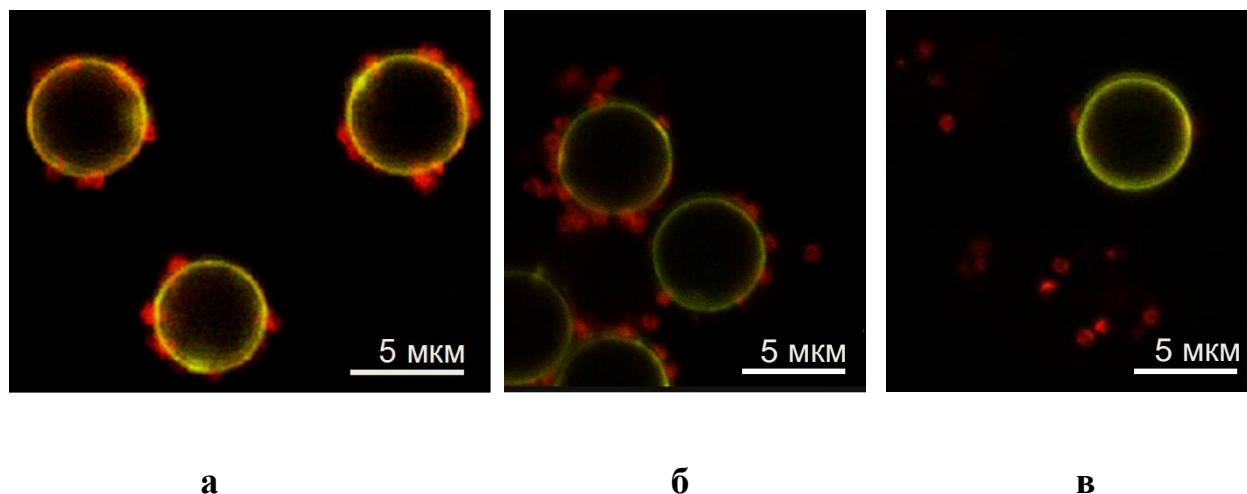


Рис. 11. Изображения многокомпонентных частиц до ферментативной реакции (а) и после 15 минут (б) и 30 минут (в) инкубации в растворе проназы (конфокальная микроскопия)

3.5.3 Разрушение полиэлектролитной оболочки, состоящей из полипептидов, под действием проназы

Для того чтобы понять, как разрушается оболочка из полипептидов под действием фермента, изучали воздействие проназы на оболочки, состоящие из разного числа слоев полиэлектролитов. На ядрах карбоната кальция были получены капсулы из полиаргинина и полиглутаминовой кислоты, содержащие внутри ФИТЦ-декстран для визуализации в конфокальном микроскопе, состоящие из четырех и восьми бислоев полиэлектролитов со структурой (PArg/PGlu)₄ и (PArg/PGlu)₈ (Рис. 45). Капсулы инкубировали в растворе проназы с концентрацией 1 мг/мл при температуре 37°C. Изображения конфокальной микроскопии показывают, что происходит постепенное разрушение оболочки под действием фермента, которое выражается в уменьшении размера капсул и их деформации. Было показано, что в случае 8 бислоев (Рис. г-е) оболочка разрушается медленнее, чем в случае 4 бислоев (Рис.): после 1.5 часов ферментативной реакции средний размер капсул сократился с начального 5 мкм до 3 мкм для капсул, состоящих из восьми бислоев и 1 мкм для четырех бислоев. В качестве контроля капсулы выдерживались при температуре 37°C в течение 1 ч., после чего размер капсул не изменился.

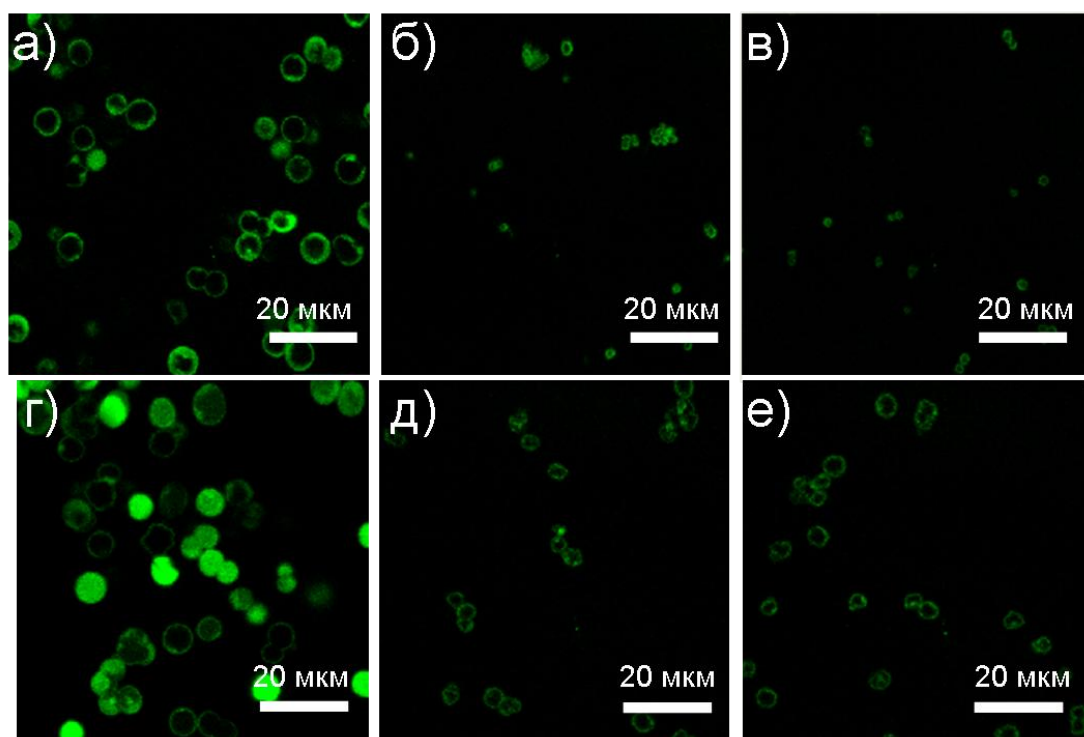


Рис. 45. Изображения, полученные методом конфокальной микроскопии, полиэлектролитных капсул из 8 слоев полиэлектролитов до (а) и после 1 (б) и 1.5 часов (в) воздействия фермента; и из 16 слоев полиэлектролитов до (г) и после 1 (д) и 1.5 (е) часов воздействия фермента.

Капсулы из полиаргинина и полиглутаминовой кислоты, состоящие из четырех и восьми бислоев полиэлектролитов с одним слоем TRITC-pArg также инкубировали в растворе проназы. Изображения, полученные методами конфокальной и атомно-силовой и сканирующей электронной микроскопии, показывают, что происходит уменьшение размеров капсул (Рис. 46, 47). После 1.5 часов ферментативной реакции средний размер капсул сократился с начального 4 мкм до 2,5 мкм для капсул, состоящих из восьми бислоев и 1,5 мкм для четырех бислоев. Таким образом, было показано, что время разрушения оболочки ферментом можно контролировать числом полиэлектролитных слоев.

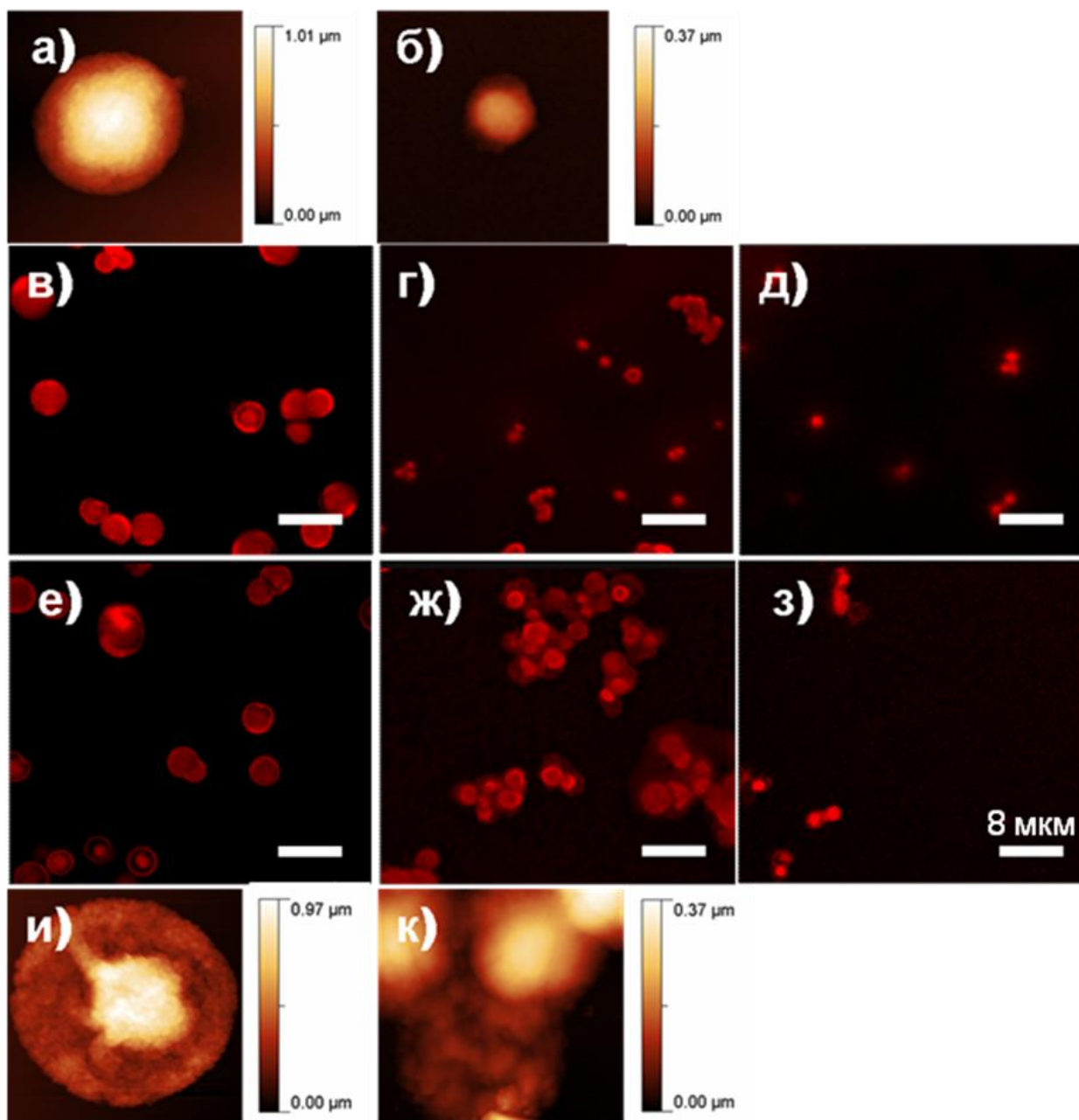


Рис. 46. Изображения, полученные методом конфокальной и атомно-силовой микроскопии, полиэлектролитных капсул из 8 слоев полиэлектролитов до (а, в) и после 1.5 (б,г) и 2.5 часов (д) воздействия фермента. Изображения, полученные методом конфокальной и атомно-силовой микроскопии, полиэлектролитных капсул из 16 слоев полиэлектролитов до (е,и) и после 1.5 (ж,к) и 2.5 (з) часов воздействия фермента (размер АСМ изображений 5*5 мкм).

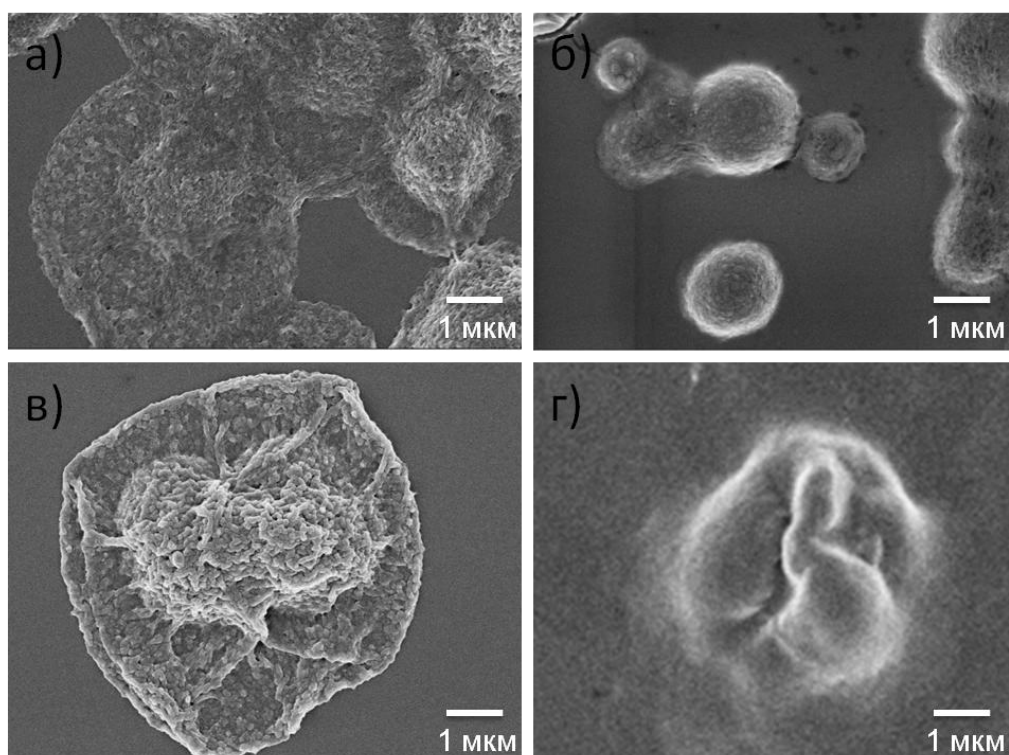


Рис. 47. (а,б) - Изображение в сканирующем электронном микроскопе полиэлектролитных капсул из 8 слоев полиэлектролитов до (а) и после (б) 1 часа воздействия фермента; (в, г) - полиэлектролитные капсулы из 16 слоев полиэлектролитов до (в) и после 1 часа (г) воздействия фермента

Концентрация фермента также влияет на скорость разрушения капсул. Капсулы, состоящие из 4 бислоев биоразложимых полиэлектролитов с составом $(PArg/PGlu)_4$ инкубировали в растворе проназы с различной концентрацией. Внутри капсул был закапсулирован ФИТЦ-декстран для их визуализации в конфокальном микроскопе. На Рис показано постепенное разрушение капсул, выражающееся в уменьшении их размера, в случае, когда концентрация проназы составляла 1 мг/мл. Видно, что после 30 минут воздействия фермента средний размер капсул уменьшается с 5 мкм до 4 мкм (Рис. 48). Повышение концентрации проназы до 5 мг/мл приводит к более быстрому разрушению капсул (Рис. 49). В этом случае после 30 минут воздействия фермента средний размер капсул уменьшается с 5 мкм до 1 мкм.

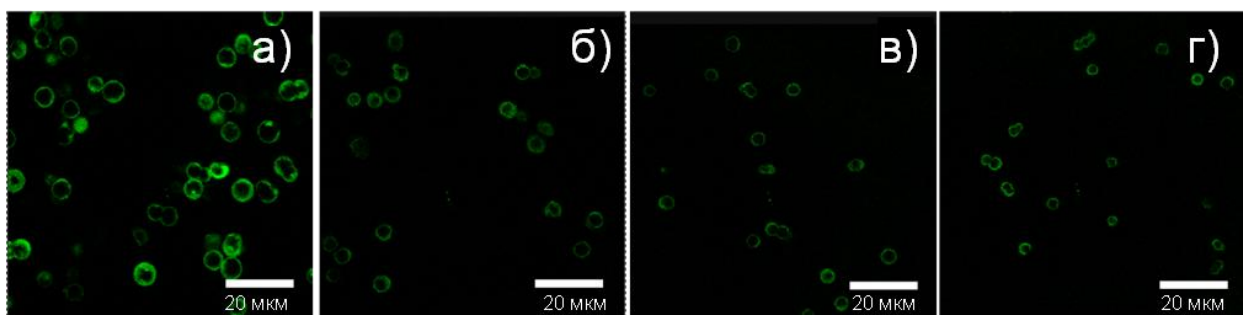


Рис. 48. Изображения полиэлектролитных капсул из 4 бислоев полиэлектролитов до (а) и после 30 (б), 60 (в) и 90 (г) мин воздействия проназы с концентрацией 1 мг/мл (конфокальная флуоресцентная микроскопия)

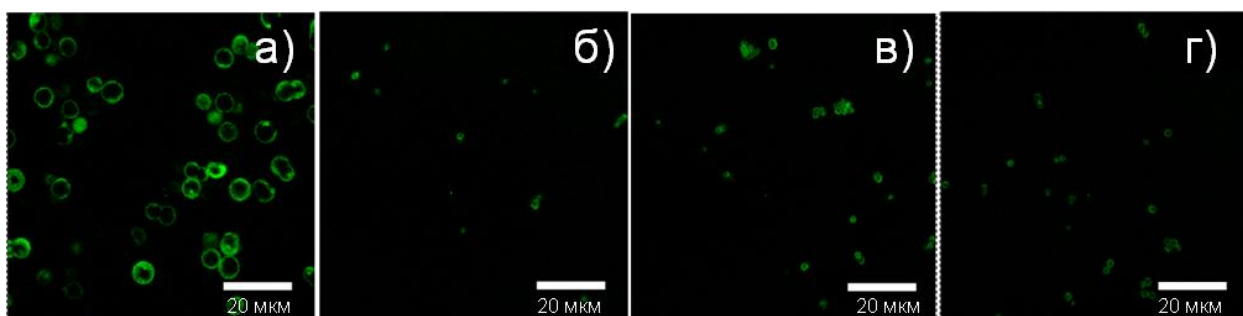


Рис. 49. Изображения полиэлектролитных капсул из 4 бислоев полиэлектролитов до (а) и после 30 (б), 60 (в) и 90 (г) мин воздействия проназы с концентрацией 5 мг/мл (конфокальная флуоресцентная микроскопия)

Для изучения влияния состава оболочки на скорость ее разрушения были получены капсулы, часть оболочки которых состояла из биоразложимых, а часть - из синтетических полиэлектролитов. Были получены капсулы с различным составом: $(pArg/pGlu)_3/ PAH/PSS$, $(pArg/pGlu)/ (PAH/PSS)_2 /pArg/pGlu$ и $PAH/PSS/ (pArg/pGlu)_3$. Затем эти капсулы подвергали воздействию проназы. Видно, что в случае, когда синтетические слои были во внешней части (Рис. 50 а-г) или в середине оболочки (Рис. 50 д-з) после воздействия фермента с капсулами не происходит изменений. По-видимому, фермент не проникает сквозь синтетические слои и разрушения капсул не происходит. В случае, когда бислоем синтетических полиэлектролитов был во внутренней части оболочки, происходит постепенное разрушение капсул, причем более медленное, чем для капсул, состоящих только из биоразложимых полиэлектролитов (Рис. 50 и-м): после 2 часов воздействия фермента средний размер капсул уменьшается с 4 мкм до 2 мкм, а через 3 часа капсулы были полностью разрушены.

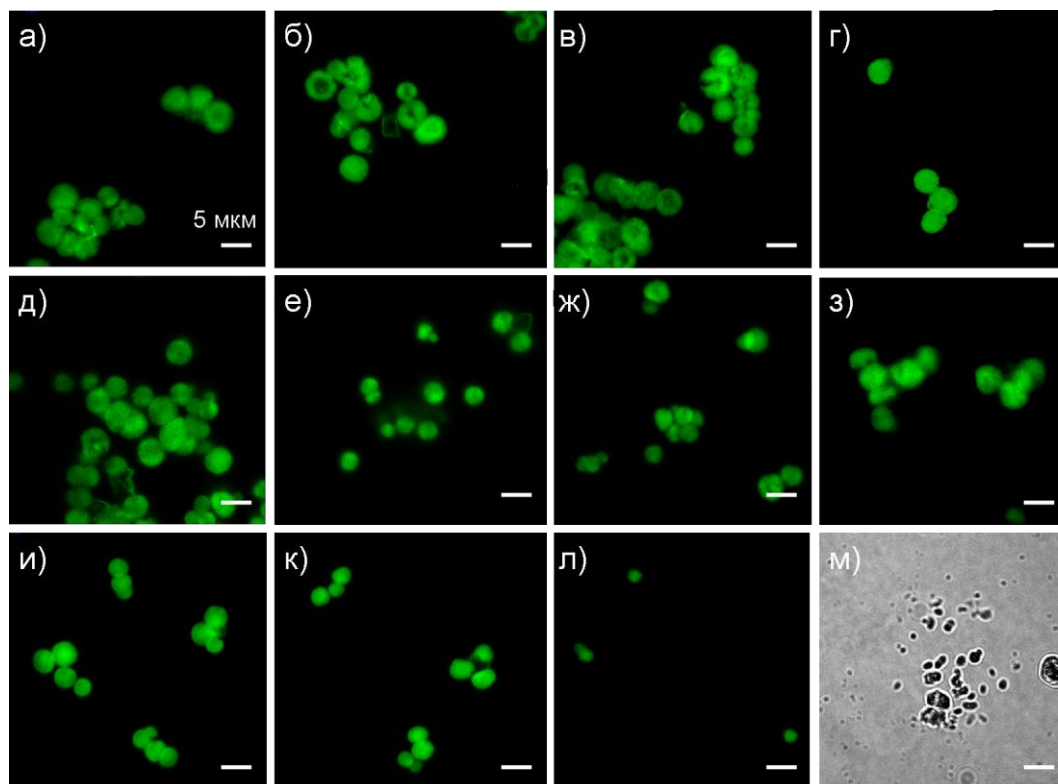


Рис. 50. (а-г) Изображения капсул с составом $(p\text{Arg}/p\text{Glu})_3/\text{PAA}/\text{PSS}$ до (а) и через 30 минут (б), 2 часа (в) и 3 часа (г) инкубации в растворе проназы;

(д-з) Изображения капсул с составом $(p\text{Arg}/p\text{Glu})/(\text{PAA}/\text{PSS})_2/p\text{Arg}/p\text{Glu}$

до (д) и через 30 минут (е), 2 часа (ж) и 3 часа (з) инкубации в растворе проназы;

(и-м) Изображения капсул с составом $\text{PAA}/\text{PSS}/(p\text{Arg}/p\text{Glu})_3$ до (и) и через 10 минут (к), 2 часа (л) и 3 часа (м) инкубации в растворе проназы

Как показано в [94], добавление ЭДТА ингибирует действие проназы. Так как после растворения ядер капсул в образце может находиться некоторое количество ЭДТА, оставшееся после промывки, был проведен эксперимент для определения влияния остатков ЭДТА на скорость ферментативной реакции. Для этого к суспензии капсул, помимо раствора проназы был добавлен 10 мМ водный раствор хлорида кальция. Ионы кальция, образуя связь с ЭДТА, нейтрализуют ее действие. Изображения капсул в конфокальном микроскопе, полученные после 10 минут воздействия фермента показывают, что добавление хлорида кальция не повлияло на размер капсул. Таким образом, можно сделать вывод, что количество ЭДТА незначительно и ее влияние на реакцию пренебрежимо мало.

Средний размер капсул через различное время ферментативной реакции для различного состава оболочек и концентрации проназы.

	средний диаметр капсул, мкм				
	исходные	30 мин	60 мин	90 мин	120 мин
(PArg/PGlu) ₄ концентрация проназы 1 мг/мл	5	4	3.5	3	
(PArg/PGlu) ₄ концентрация проназы 5 мг/мл	5	1	1	1	
(PArg/PGlu) ₈ концентрация проназы 5 мг/мл	5	4	3	3	
PAH/PSS/ (pArg/pGlu) ₃ концентрация проназы 1 мг/мл	4.5	4.5	4	3	2.5
(pArg/pGlu) ₃ / PAH/PSS концентрация проназы 1 мг/мл	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5

Таким образом, было продемонстрировано разделение многокомпонентных микрочастиц, содержащих в оболочке биоразложимые полиэлектролиты, под действием фермента и показано, что время расщепления оболочки из биоразложимых полиэлектролитов зависит от концентрации фермента, числа полиэлектролитных слоев и полиэлектролитов, из которых состоит оболочка. Возможность контролировать скорость ферментативного разрушения оболочки

может быть использована для контролируемого высвобождения закапсулированного материала а также для контролируемого разделения многокомпонентных капсул.

3.6 Микроконтейнеры на основе частиц карбоната кальция для доставки лоперамида

Контейнеры на основе микрочастиц карбоната кальция. Было предложено в качестве системы доставки лекарственных соединений в центральную нервную систему (ЦНС) при их интраназальном введении использовать пористые микрочастицы карбоната кальция. Такие частицы обладают высокой адсорбционной способностью к широкому диапазону соединений, их пористая структура (Рис. 51) обеспечивает высокую степень загрузки функциональным веществом контейнеров на их основе. Активные области поверхности контейнеров могут способствовать адсорбции частиц на слизистой оболочке, таким образом предотвращая их быстрое удаление.

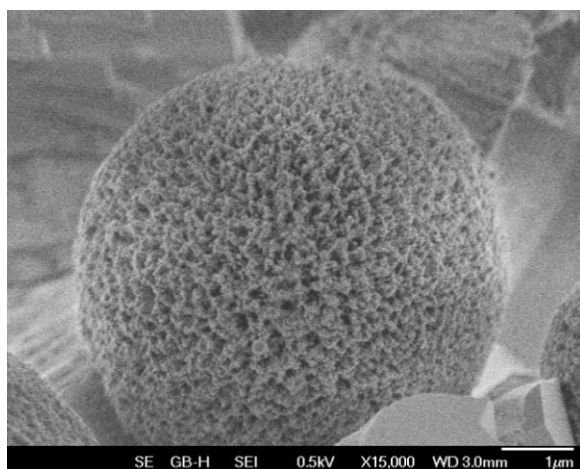


Рис. 51. Изображения микрочастиц карбоната кальция, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии

В качестве модельного лекарственного вещества использовали центральный анестетик лоперамид. Известно, что это вещество не способно проникать через гематоэнцефалический барьер [100]. Проникновение лоперамида в мозг может быть подтверждено с помощью изменения болевой чувствительности. Количество загруженного в контейнеры лоперамида может быть определено, измеряя спектр поглощения раствора. Спектр поглощения лоперамида имеет четыре характеристических пика: 253, 259, 265 и 273 нм (Рис. 52). Количество

адсорбированного на поверхность частиц лоперамида было определено вычитанием из оптической плотности раствора лоперамида на длине волны 259 нм оптической плотности раствора супернатанта на этой длине волны после адсорбции. Полученное таким образом количество загруженного лоперамида составило 0.02 мг лоперамида на 1 мг карбоната кальция.

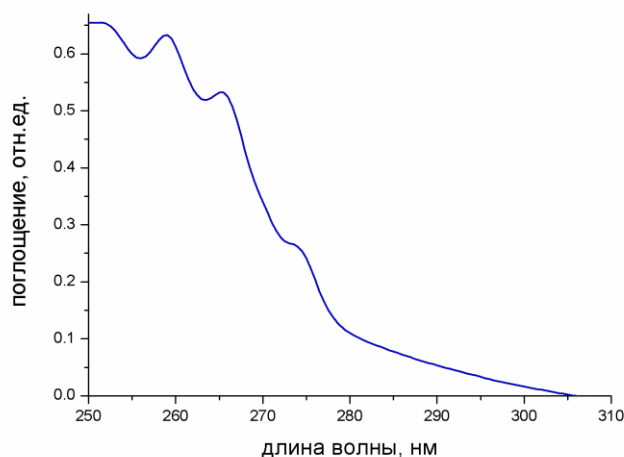


Рис. 52. Спектр поглощения спиртового раствора лоперамида.

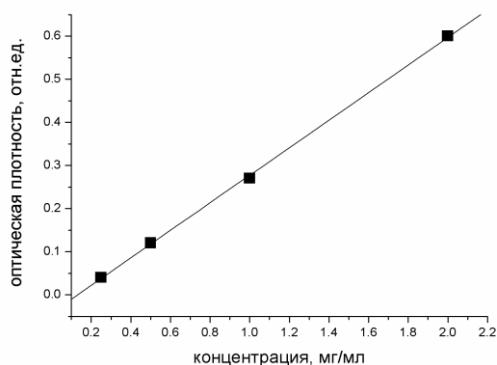


Рис. 53. Зависимость оптической плотности спиртового раствора лоперамида на длине волны 259 нм от его концентрации.

С целью продления времени нахождения контейнеров в назальной полости поверхность частиц модифицировали гиалуроновой кислотой, обладающей мукоадгезивными свойствами.

Результаты *in vivo*-теста. Выводы о доставке лоперамида в ЦНС крыс делали на основании изменения их болевой чувствительности, используя формалиновый тест [101, 102]. Суспензию нагруженных лоперамидом частиц интраназально вводили крысам. Далее после подкожного введения формальдегида в лапу крысы после определенного промежутка времени фиксировали ее поведение и оценивали болевую чувствительность по системе баллов. Все временные точки усредняли по группе, данные обрабатывали с помощью программы STATISTICA-7. В качестве контроля использовали раствор лоперамида в 5% растворе глюкозы без частиц, а также суспензии самих частиц без лоперамида.

Результаты *in vivo*-теста показали, что использованные частицы, нагруженные лоперамидом, снижали болевую чувствительность крыс (рис. 54). Это означает, что контейнеры на основе пористых частиц CaCO_3 обеспечивают доставку лоперамида в ЦНС крысы. Модификация частиц мукоадгезивным соединением приводит к повышению эффективности действия контейнеров в начале теста и на больших временах (рис. 54). При использовании частиц карбоната кальция, покрытых гиалуроновой кислотой, болевая чувствительность крыс на 6 мин и с 48 по 66 мин снижается практически в два раза.

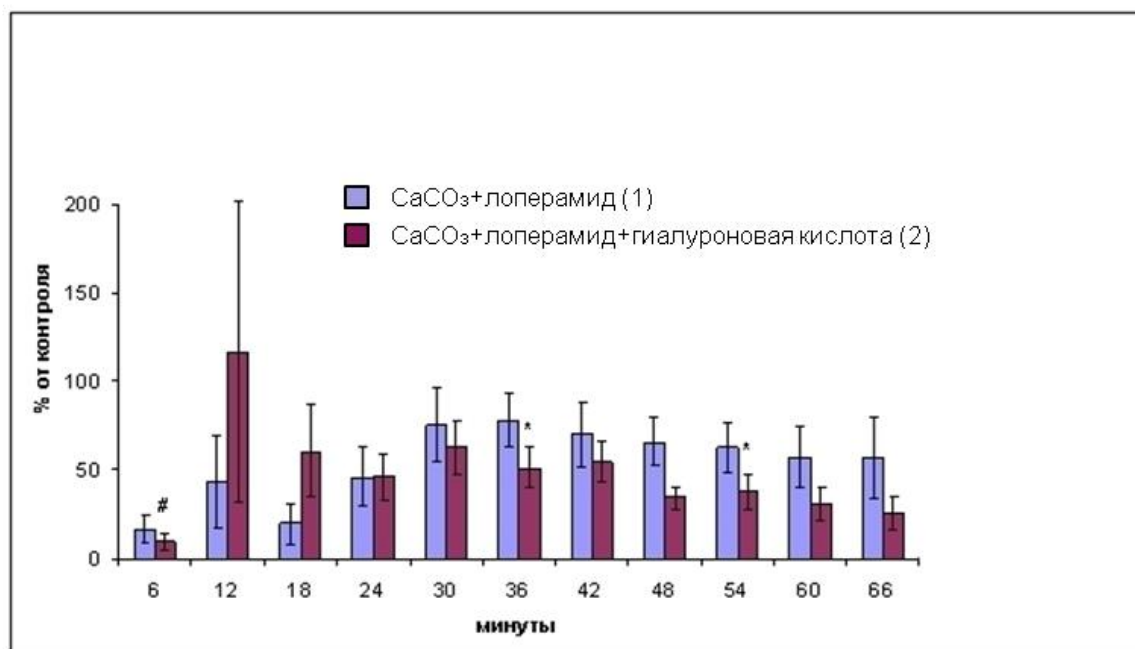


Рис. 54. Результаты *in vivo*-теста для систем на основе частиц карбоната кальция: 1 – не модифицированные частицы; 2 – частицы, покрытые гиалуроновой кислотой.

Таким образом, в работе предложена новая система доставки функциональных соединений в мозг при их интраназальном введении – контейнеры на основе пористых частиц карбоната кальция. Простота получения контейнеров в сочетании с преимуществами интраназального способа введения препаратов обеспечивают перспективность предложенной системы для медицинских применений.

Основные результаты и выводы:

1. Предложен механизм формирования нанокompозитных полиэлектролитных капсул с наночастицами серебра с использованием реакции серебряного зеркала. Спектр поглощения образовавшихся наночастиц имеет широкую полосу поглощения в видимой области спектра, что может быть использовано для вскрытия капсул с использованием лазерного излучения. Показано разрушение капсул с наночастицами серебра в оболочке под действием лазера с длиной волны 532 нм.
2. Осуществлено капсулирование в полиэлектролитные оболочки флуоресцентных красителей с разными зарядами: отрицательного 3,3'-ди-(γ -сульфопропил)-4,4',5,5'-добензо-9-этилтиакарбоцианинбетаина, положительного 3,3'-диэтилтиа-карбоцианина и нейтрального перилена. Для капсулирования этих красителей оказались эффективными два способа: адсорбция на пористых ядрах и замена растворителя.
3. Включение в оболочку полиэлектролитных капсул красителей родамина 6Ж и флуоресцеина изотиоцианата обеспечивает разрушение капсул под действием лазерного излучения с длиной волны 532 нм, находящегося в полосе поглощения обоих красителей. Предложен механизм такого разрушения за счет переноса энергии фотовозбуждения от молекул красителя к полимерной матрице. Показано различие воздействия лазера на оболочку с адсорбированным и химически связанным красителем.
4. Получены многокомпонентные полиэлектролитные капсулы, состоящие из нескольких капсул, соединенных между собой. Показано разделение многокомпонентных микрочастиц, содержащих в оболочке биоразложимые полиэлектролиты, под действием фермента. Время расщепления оболочки из биоразложимых полиэлектролитов зависит от концентрации фермента, состава оболочки и числа полиэлектролитных слоев.
5. Созданы контейнеры на основе микрочастиц карбоната кальция для доставки анестетика лоперамида в центральную нервную систему при интраназальном введении.

Благодарности

Автор выражает благодарность

своим научным руководителям Т.В. Букреевой и Г. С. Плотникову за возможность проведения работы под их внимательным руководством и всестороннюю поддержку,

Л.А. Фейгину, Б.В. Парахонскому, А.Г. Скиртачу, А.М. Яценку, Т.Н. Бородиной, А.Н. Баранову, А.М. Салецкому, Ю.В. Моисеевой и Г.В. Парахонскому за помощь в работе, ценные советы и обсуждение результатов,

Ю.В. Григорьеву и В.В. Артемову за исследование образцов методами просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии.

Список литературы:

1. Decher G. and Hong J.D. Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process. 2. Consecutive Adsorption of Anionic and Cationic Bipolar Amphiphiles and Polyelectrolytes on Charged Surfaces // *Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics*. – 1991. - V. 95, № 11. - P. 1430-1434.
2. Decher G., Hong J.D. and Schmitt J. Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process. 3. Alternating Adsorption of Anionic and Cationic Polyelectrolytes on Charged Surfaces // *Thin Solid Films*. - 1992. - V. 210, № 1-2. - P. 831-835.
3. Львов Ю.М. Молекулярные пленки - упорядоченные нанокompозиты из полиионов, белков и керамики // *Природа*. - 1997. – Т. 3, № 979. – С. 37-50.
4. Johnston A. P. R, Zelikin A. N., Lee L. et al. Approaches to Quantifying and Visualizing Polyelectrolyte Multilayer Film Formation on Particles // *Anal. Chem.* - 2006. – V. 78. –P. 5913-5919.
5. Sukhorukov G.B., Donath E., Lichtenfeld H. et al. Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles // *Colloids and surfaces*. -1998. – V. 137. P. 253-266.
6. Estrela-Lopis I., Leporatti S., Moya S. et al. SANS studies of polyelectrolyte multilayers on colloidal templates // *Langmuir*. - 2002. – V. 18. – P. 7861-7866.
7. Volodkin D.V., Petrov A.I., Prevot M., Sukhorukov G.B. Matrix Polyelectrolyte Microcapsules: New System for Macromolecule Encapsulation // *Langmuir*. - 2004. – V. 20. P. 3398-3406.
8. Mayya S., Schoeler B., Caruso F. Preparation and Organization of Nanoscale Polyelectrolyte-Coated Gold Nanoparticles // *Adv. Funct. Mater.* - 2003. - V. 13, № 3. - P. 183-188.
9. Qiu X.P., Leporatti S., Donath E. et al. From polymeric films to nanocapsules // *Langmuir*. - 2001. - V. 17. - P. 5375-5380.
10. Shenoy D.B., Antipov A.A., Sukhorukov G.B. et al. Layer-by-layer engineered capsules and their applications // *Biomacromolecules*. - 2003. - V. 4. - P.265.
11. Donath E., Sukhorukov G.B., Caruso F. et al. Novel hollow polymer shells by colloid-templated assembly of polyelectrolytes // *Angew. Chem.* -1998. V. 37. – P. 2202-2205.

-
12. Sukhorukov G.B., Donath E., Davis S.A. et al. Stepwise polyelectrolyte assembly on particle surfaces: a novel approach to colloid design // *Polym. Adv. Technol.* -1998. - V. 9. – P.1-9.
 13. Sukhorukov G.B., Shchukin D.G., Dong W. et al. Comparative Analysis of Hollow and Filled Polyelectrolyte Microcapsules Templated on Melamine Formaldehyde and Carbonate Cores // *Macromol. Chem. Phys.* - 2004. – V. 205. – P. 530-535.
 14. Sukhorukov G. B., Donath E. et al. Microencapsulation by means of step-wise adsorption of polyelectrolytes // *Journal of Microencapsulation.* – 2000. – V. 172. – P. 177-185.
 15. Sukhorukov G. B., Brumen M. et al. Hollow polyelectrolyte shells: Exclusion of polymers and donnan equilibrium // *Journal of Physical Chemistry B.* - 1999. – V. 103, №31. – P. 6434-6440.
 16. Moya S., Donath E., Sukhorukov G. B. et. al. Lipid Coating on Polyelectrolyte Surface Modified Colloidal Particles and Polyelectrolyte Capsules // *Macromolecules.* – 2000. – V. 33. – P. 4538-4544.
 17. Sukhorukov G. B., Antipov A. A. et al. pH-controlled macromolecule encapsulation in and release from polyelectrolyte multilayer nanocapsules. - *Macromolecular Rapid Communications.* – 2001. – V. 22, № 1. – P. 44-46.
 18. Lvov Y., Antipov A. A. et al. Urease encapsulation in nanoorganized microshells // *Nano Letters.* – 2001. - V. 1, № 3. – P. 125-128.
 19. Sukhorukov G. B., Donath E. et al. Stepwise polyelectrolyte assembly on particle surfaces: a novel approach to colloid design // *Polymers for Advanced Technologies.* – 1998. – V. 9, № 10-11. – P. 759-767.
 20. Kohler K., Shchukin D. G. et al. Thermal behavior of polyelectrolyte multilayer microcapsules. The effect of odd and even layer number // *Journal of Physical Chemistry B.* - 2005. – V. 109, № 39. – P. 18250-18259.
 21. Sukhorukov G., Dahne L., Hartmann J. et al. Controlled Precipitation of Dyes into Hollow Polyelectrolyte Capsules Based on Colloids and Biocolloids // *Adv. Mater.* – 2000. V. 12, №. 2. – P. 112-115.
 22. Liu X., Gao C., Shen J., Mohwald H. Multilayer Microcapsules as Anti-Cancer Drug Delivery Vehicle: Deposition, Sustained Release, and in vitro Bioactivity // *Macromol. Biosci.* – 2005. – V. 5. – P. 1209–1219.

-
23. Zhao Q, Han B., Wang Z., Gao C., Peng C. Hollow chitosan-alginate multilayer microcapsules as drug delivery vehicle: doxorubicin loading and in vitro and in vivo studies // *Biology and Medicine*. – 2007. – V. 3, № 1. – P. 63-74.
24. Kitamura M. J. Crystallization and Transformation Mechanism of Calcium Carbonate Polymorphs and the Effect of Magnesium Ion // *Colloid Interface Sci.* - 2001. - V. 236. - P. 318-327.
25. Horn D., Rieger J. Organic Nanoparticles in the Aqueous Phase - Theory, Experiment, and Use // *Angew. Chem., Int. Ed.* - 2001. - V. 40, № 23. - P. 4330-4361.
26. Sukhorukov G. B, Volodkin D.V., Günther A. M. et al. Porous calcium carbonate microparticles as templates for encapsulation of bioactive compounds // *J. Mater. Chem.* – 2004. - V. 14. – P. 2073 – 2081.
27. Volodkin D.V., Petrov A.I., Prevot M., Sukhorukov G.B. Matrix Polyelectrolyte Microcapsules: New System for Macromolecule Encapsulation // *Langmuir*. - 2004. - V. 20, № 8. - P. 3398-3406.
28. Володькин Д.В. Иммунизация белков в микрочастицы, сформированные методом последовательной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов. Диссертация. 2005.
29. Parakhonskiy B.V., Haase A., and Antolini R. Sub-Micron Vaterite Containers: Synthesis, Substance Loading, and Release // *Angew. Chem. Int. Ed.* - 2011. – V. 50. – P. 1 – 4.
30. Petrov A. I., Volodkin D. V. and Sukhorukov G. B. Protein-Calcium Carbonate Coprecipitation: A Tool for Protein Encapsulation // *Biotechnol. Prog.* – 2005. – V. 21. – P. 918–92.
31. Bedard M., De Geest B. G., Skirtach A., Moehwald H., Sukhorukov B. G. Polymeric microcapsules with light responsive properties for encapsulation and release // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2010. – V. 158. – P.2.
32. Помогайло А.Д., Розенберг А.С., Уфлянд И.Е. Наночастицы металлов в полимерах // Москва. - 2000.
33. Ролдугин В. И. Квантоворазмерные металлические коллоидные системы // *Успехи химии*. - 2000. – Т. 69, №10. – С. 899-919.

-
34. Yin Y., Li Z., Zhong Z. et al. Synthesis and characterization of stable aqueous dispersions of silver nanoparticles through the Tollens process // *Journal of Material Chemistry*. - 2002. - V.12. – P. 522 – 527.
35. Yu D., Wing-Wah Yam V. Hydrothermal – induced assembly of colloidal silver spheres into various nanoparticles on the basis of HTAB-modified silver mirror reaction. *J. Phys. Chem.* 2005. 109. 5497-5503
36. Hozumi A., Inagaki M., Shirahata N. Vapor phase formation of a well-ordered aldehyde-terminated self-assembled monolayer on a SiO₂ surface and formation of silver film on the surface based on the silver mirror reaction // *Surface science*. - 2006. – V. 600. –P. 4044-4047.
37. Hozumi A., Inagaki M., Shirahata N. Spatially defined silver mirror reaction on a micropatterned aldehyde-terminated self-assembled monolayer // *Applied surface science*. - 2006. – V. 252. P. 6111-6114.
38. Сергеев Б. М., Кирюхин М. В., Бахов Ф. Н., Сергеев В. Г. Фотохимический синтез наночастиц серебра в водных растворах поликарбоновых кислот. Влияние полимерной матрицы на размер и форму частиц // *Вестник Московского университета. Сер. 2. Химия*. - 2001. - Т. 42. № 5. - С. 308-314.
39. Bozani D.K., Djokovi V., Blanusa J., Nair P.S., Georges M.K., Radhakrishnan T. Preparation and properties of nano-sized Ag and Ag₂S particles in biopolymer matrix // *Eur. Phys. J. E*. – 2007. – V. 22. – P. 51–59.
40. Zhou J., Xu S., Xu W., Zhao B. and Ozakib Y. In situ nucleation and growth of silver nanoparticles inmembranematerials: a controllable roughened SERS substrate with high reproducibility // *J. Raman Spectrosc.* – 2009. – V. 40. – P. 31–37.
41. Logar M., Jancar B., Suvorov D. and Kostanjsek R. In situ synthesis of Ag nanoparticles in polyelectrolyte multilayers // *Nanotechnology*. – 2007. – V. 18 , 325601 (7pp) doi:10.1088/0957-4484/18/32/325601.
42. Veletanlic E. and Cynthia Goh M. Polyelectrolyte Multilayer Films as Templates for the In Situ Photochemical Synthesis of Silver Nanoparticles // *J. Phys. Chem. C*. - 2009. – V. 113. – P. 18020–18026.
43. Antipov A.A., Sukhorukov G.B., Fedutik Yu. A. et al. Fabrication of a novel type of metallized colloids and hollow capsules // *Langmuir*. - 2002. – V. 18. P. 6687-6693.
44. Kreibig U., Vollmer M. Optical properties of metal clusters // *Berlin*. - 1995.

-
45. Kreibig U., Quinten M., Shoenauer D. Optical properties of many-particle systems // *Physica Scripta*. - 1986. – V. 13. – P. 84-92.
46. Rechberger W., Hohenau A., Leitner A. et al. Optical properties of two interacting gold nanoparticles // *Optic communications*. - 2003. – V. 220. P. 137-141.
47. Cho J., Caruso F. Investigation of the Interactions between Ligand-Stabilized Gold Nanoparticles and Polyelectrolyte Multilayer Films // *Chem. Mater.* - 2005.- V. 17. – P. 4547-4553.
48. Jiang C., Markutsya S., Tsukruk V. V. Collective and Individual Plasmon Resonances in Nanoparticle Films Obtained by Spin-Assisted Layer-by-Layer Assembly // *Langmuir*. - 2004. – V. 20, № 3. – P. 882-890.
49. Букреева Т.В., Парахонский Б.В., Скиртач А.Г. и др. Получение полиэлектролитных микрокапсул с наночастицами серебра и золота в оболочке и дистанционное разрушение таких капсул воздействием лазерного излучения // *Кристаллография*. - 2006. - Т. 51, № 5. - С. 183.
50. Skirtach A.G., Antipov A.A, Shchukin D. G. et al. Remote activation of capsules containing Ag nanoparticles and IR dye by laser light // *Langmuir*. - 2004. – V. 20. – P. 6988-6992.
51. Skirtach A., Javier A., Kreft O. et al. Laser-induced release of encapsulated materials inside living cells // *Angew. Chem.* - 2006. – V. 45. – P. 4612-4617.
52. Skirtach A.G., Dejugnat C., Braun D. et al. The role of metal nanoparticles in remote release of encapsulated materials // *Nano Letters*. - 2005. – V. 5. №7. P. 1371-1377.
53. Pitsilides C. M., Joe E.K., Wei X. et al. Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles // *Biophysical journal*. - 2003. – V. 84. – P. 4023-4032.
54. Zaitsev V.B., Nevzorov A.N., Plotnikov G.S. Optical Properties Of Ferroelectric Lanmuir-Blodgett Films Impregnated With Dye Molecules // *Materials Science*. - 2002. - V. 20. №3. - P. 37-42.
55. Беляев В.В., Зайцев В.Б., Панова Т.В. и др. Влияние заряженных поверхностных состояний на структуру тонких пленок Ленгмюра-Блоджетт на поверхности полупроводников // *Вестник МГУ. Серия 3. Физика, астрономия*. - 2002. - №1. - С. 44-48.

-
56. Басе М., Дейч Т., Вебер М. Лазеры на красителях // Успехи физических наук. - 1971. - Т. 105, вып. 3, С. 521-571.
57. Бахшиев Н.Г. Межмолекулярные релаксационно-флуктационные процессы и спектры люминесценции растворов // Изв. АН СССР, сер. Физическая. – 1973. - Т. 37. - С. 284-289.
58. Плотников Г.С., Зайцев В.Б. Физические основы молекулярной электроники // М.: МГУ. - 2000. - С.164.
59. Cooper T.; Campbell A., Crane R. Formation of polypeptide-dye multilayers by electrostatic self-assembly technique // Langmuir. – 1995. – V. 11. – P. 2713.
60. Araki K., Wagner M. J., Wrighton M. S. Layer-by-Layer Growth of Electrostatically Assembled Multilayer Porphyrin Films // Langmuir. – 1996. – V. 12. – P. 5393-5398.
61. Ariga K., Lvov Yu., and Kunitake T. Assembling Alternate Dye-Polyion Molecular Films by Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption // J. Am. Chem. Soc. – 1997. – V. 119. – P. 2224-2231.
62. Bedard M., Skirtach A. G., Sukhorukov G. B. Optically Driven Encapsulation Using Novel Polymeric Hollow Shells Containing an Azobenzene Polymer // Macromol. Rapid Commun. – 2007. – V. 28. – P. 1517–1521.
63. Dante S., Advincula R., Frank C. W., Stroeve, P. Photoisomerization of Polyionic Layer-by-Layer Films Containing Azobenzene // Langmuir. - 1999. – V. 15.- P. 193.
64. Katagiri K., Koumoto K., Iseya S., Sakai M., Matsuda A., Caruso F. Tunable UV-Responsive Organic-Inorganic Hybrid Capsules // Chem. Mater. – 2009. – V. 21. – P. 195.

-
65. Bedard M., Munoz-Javier A., Mueller R., del Pino P., Fery A., Parak W.J. et al. Remote Near-IR Light Activation of a Hyaluronic Acid/Poly(l-lysine) Multilayered Film and Film-Entrapped Microcapsules // *Soft Matter*. - 2009. – V. 5, № 1. – P. 148–55.
66. Caruso F., Lichtenfeld H., Donath E., Mohwald H. Investigation of Electrostatic Interactions in Polyelectrolyte Multilayer Films: Binding of Anionic Fluorescent Probes to Layers Assembled onto Colloids // *Macromolecules*. - 1999. – V. 32, № (7). – P. 2317–2328.
67. Dai Z.F., Voigt A., Leporatti S., Donath E., Dahne L., Mohwald H. Layer-by-Layer Self-Assembly of Polyelectrolyte and Low Molecular Weight Species into Capsules // *AdvMater*. - 2001. – V. 13, № 17. – P. 1339–42.
68. Tao X., Li J., and Mohwald H. Self-Assembly, Optical Behavior, and Permeability of a Novel Capsule Based on an Azo Dye and Polyelectrolytes // *Chem. Eur. J.* – 2004. – V. 10. – P. 3397 -3403.
69. Bedard M. F., Sadasivan S., Sukhorukov G. B. and Skirtach A. Assembling polyelectrolytes and porphyrins into hollow capsules with laser-responsive oxidative properties // *J. Mater. Chem.* - 2009.- V. 19. - P. 2226–2233.
70. Saphiannikova M., Radtchenko I., Sukhorukov G., Shchukin D., Yakimansky A., and Ilnytskyi J. Molecular-dynamics simulations and x-ray analysis of dye precipitates in the polyelectrolyte microcapsules // *J. Chem. Phys.* – 2003. – V. 118. – P. 9007.
71. Gaponik N., Radtchenko I.L., Sukhorukov G.B. and Rogach A.L. Luminescent Polymer Microcapsules Addressable by a Magnetic Field // *Langmuir*. - 2004. – V. 20. – P. 1449-1452.
72. Jelly E. E. Molecular, Nematic and Crystal States of I: I-Diethyl-Cyanine Chloride // *Nature*. - 1937. – V. 139. – P. 631.
73. Scheibe G. About the variability of the absorption spectra in solutions and the secondary valences as their cause // *Angewandte Chemie* . – 1937. – V. 50, № 11. – P. 212–219.
74. Chandrawati R., Hosta-Rigau L., Vanderstraaten D., Lokuliyana S. A., Stadler B., Albericio F. and Caruso F. Engineering Advanced Capsosomes: Maximizing the Number

of Subcompartments, Cargo Retention, and Temperature-Triggered Reaction // ACS Nano. - 2010. - V. 4, №3. - P. 1351–1361.

75. Li Z., Kesselman E., Talmon Y., Hillmyer M. A. and Lodge T. P. Multicompartment Micelles from ABC Miktoarm Stars in Water // Science. - 2004. - P. 98-101.

76. Kreft O., Skirtach A. G., Sukhorukov G. B., and Möhwald H. Remote Control of Bioreactions in Multicompartment Capsules // Adv. Mater. - 2007. - V. 19. - P. 3142–3145.

77. Delcea M., Yashchenok A., Videnova K., Kreft O., Mohwald H., Skirtach A.G. Multicompartmental Micro- and Nanocapsules: Hierarchy and Applications in Biosciences // Macromol. Biosci. - 2010. - V. 10. - P. 465.

78. Kreft O., Javier A.M., Sukhorukov G.B. and Parak W.J. Polymer microcapsules as mobile local pH-sensors // J. Mater. Chem. - 2007. - V. 17. - P. 4471–4476.

79. Chinnayelka S., McShane M.J. Glucose-sensitive nanoassemblies comprising affinity-binding complexes trapped in fuzzy microshells // J Fluorescence. - 2004. - V. 14. - P. 585–595.

80. Chinnayelka S. and McShane M. J. Microcapsule Biosensors Using Competitive Binding Resonance Energy Transfer Assays Based on Apoenzymes // Anal. Chem. - 2005. - V. 77. - P. 5501-5511.

81. De Geest B.G., De Koker S., Sukhorukov G.B. et. al. Polyelectrolyte microcapsules for biomedical applications. // Soft Matter. - 2009. - V. 5, № 2. - P. 282.

82. Gorin D.A., Portnov S.A., Inozemtseva O.A., Luklinska Z., Yashchenok A.M., Pavlov A.M., Skirtach A.G, Mohwald H., Sukhorukov G.B. Magnetic/gold nanoparticle functionalized biocompatible microcapsules with sensitivity to laser irradiation // Phys. Chem. Chem. Phys. - 2008. - V. 10. - P. 6899.

83. Lee H. , Jeong Y. and Park T. G. Shell Cross-Linked Hyaluronic Acid/Polylysine Layer-by-Layer Polyelectrolyte Microcapsules Prepared by Removal of Reducible Hyaluronic Acid Microgel Cores // Biomacromolecules. - 2007. - V. 8, № 12. - P. 3705–3711.

84. Berth G., Voigt A., Dautzenberg H., Donath E., Mohwald H. Formation of Biocompatible Nanocapsules with Emulsion Core and Pegylated Shell by Polyelectrolyte Multilayer Adsorption // Biomacromolecules. - 2002. - V. 3. - P. 579.

-
85. Egles N. Jessel, J. C., Voegel C., Picart A., Schneider O., Etienne J., Mutterer P., Schaaf C. Controlled Degradability of Polysaccharide Multilayer Films In Vitro and In Vivo // *Adv. Funct. Mater.* – 2005. V. 15. – P. 1771.
86. De Geest B. G., Vandenbroucke R. E., Guenther A. M., Sukhorukov G. B., Hennink W. E., Sanders N. N., Demeester J., De Smedt S. C. Intracellularly Degradable Polyelectrolyte Microcapsules // *Adv. Mater.* – 2006. – V. 18. P. 1005.
87. De Koker S., De Geest B. G., Cuvelier C., Ferdinande L., Deckers W., Hennink W. E., De Smedt S. and Mertens N. In Vivo Cellular Uptake, Degradation, and Biocompatibility of Polyelectrolyte Microcapsules // *Adv. Funct. Mater.* – 2007. – V. 17. – P. 3754–3763.
88. Itoh Y., Matsusaki M., Kida T., Akashi M. Enzyme-Responsive Release of Encapsulated Proteins from Biodegradable Hollow Capsules // *Biomacromolecules.* – 2006. – V. 7. – P. 2715.
89. Borodina T., Markvicheva E., Kunizhev S., Mohwald H., Sukhorukov G. B., Kreft O. Controlled Release of DNA from Self-Degrading Microcapsules // *Macromol. Rapid Commun.* – 2007. – V. 28. – P. 1894–1899.
90. Narahash Y., Yanagita M. Studies on Proteolytic Enzymes (Pronase) of *Streptomyces griseus* K-1 I. Nature and Properties of the Proteolytic Enzyme System // *J. Biochem.* – 1967. – V. 62. – P. 633.
91. Narahash Y., Shibuya K., Yanagita M. Studies on Proteolytic Enzymes (Pronase) of *Streptomyces griseus* K-1 II. Separation of Exo- and Endopeptidases of Pronase // *J. Biochem.* 1968. – V. 64. – P. 427.
92. Лебедев Л.Д., Левчук Ю.Н., Ломакин А.В., Носкин В.А. Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии. // Киев. Наук. Думка. – 1987.
93. Равич-Щербо М.И., Новиков В.В. Физическая и коллоидная химия // Москва. Высшая школа. – 1975. - 254 с.
94. А.Д. Помогайло, А.С. Розенберг, Е.И.Уфлянд. Наночастицы металлов в полимерах. М:Химия. 2000. 672 с.
95. Алфимов М.В., Штыкова А.А., Разумов В.Ф. Фото- и термоиницированное образование J- и H-агрегатов в аморфных дисперсиях карбоцианинового красителя // *Химия высоких энергий.* – 2006. – Т. 40. – С. 21-24.

-
96. Hiller S., Leporatti S., Schnackel A., Typlt E., Donath E. Protamine Assembled in Multilayers on Colloidal Particles Can Be Exchanged and Released // *Biomacromolecules*. – 2004. – V. 5. – P. 1580-1587.
97. Эпштейн Л.М, Шубина Е.С. Многоликая водородная связь. // Журнал "Природа". - 2003. - № 6. - С. 40-45.
98. Leporatti S., Gao C., Voigt A. et al. Shrinking of ultrathin polyelectrolyte multilayer capsules upon annealing: A confocal laser scanning microscopy and scanning force microscopy study // *Eur. Phys. J. E*. - 2001. – V. 5. - P. 13-20.
99. Kohler K., Shchukin D. G. et al. Thermal Behavior of Polyelectrolyte Multilayer Microcapsules. 1. The Effect of Odd and Even Layer Number // *Journal of Physical Chemistry B*. - 2005. – V. 109, №39. - P. 18250-18259.
100. Niemegeers C.I.L., Lenaerts F.M., Janseen P.A.J. (). Loperamide (R-18553) A novel type of antidiarrhoeal agent. Part 1. In: *VitroDrab pharmacology and acute toxicity comparing with morphine, codeine and difenoxine*. // *Atzneimittelforsch.* - 1974. – V.24, - P. 1633-1636.
101. Matthies B.K., Franklin K.B. Formalin pain is expressed in decerebrate rats but not attenuated by morphine // *Pain*. - 1992. - V. 51. - P. 199-206.
102. Matthies B.K., Franklin K.B. Effects of partial decortication on opioid analgesia in the formalin test // *Behav Brain Res.* - 1995. - V. 67. - P. 59-66.