

Ленгерт Екатерина Владимировна

**АЛЬГИНАТНЫЕ МИКРОКОНТЕЙНЕРЫ,
МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СЕРЕБРЯНЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ:
ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ**

Специальность 1.4.4. Физическая химия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Работа выполнена в центральной научно-исследовательской лаборатории федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского Минздрава России»

Научный руководитель: Кандидат физико-математических наук,
Ермаков Алексей Вадимович

Официальные оппоненты: **Якиманский Александр Вадимович**
доктор химических наук, профессор РАН,
филиал федерального государственного бюджетного
учреждения «Петербургский институт ядерной физики им.
Б.П. Константинова Национального исследовательского
центра «Курчатовский институт» - Институт
высокомолекулярных соединений, заведующий
лабораторией 14 Полимерных наноматериалов и
композиций для оптических сред

Гороховский Александр Владиленович
доктор химических наук, профессор,
федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Саратовский
государственный технический университет имени Гагарина
Ю. А.», заведующий кафедрой "Химия и химическая
технология материалов"

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Российский химико-
технологический университет имени Д. И. Менделеева»,
г. Москва

Защита состоится «13» ноября 2025 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета 24.2.392.03 на базе ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского» по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83, корп. 1, Институт химии.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В.А. Артисевич ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского» (410012, г. Саратов, ул. Университетская, д. 42) и на сайте <https://www.sgu.ru/research/dissertation-council/24-2-392-03/kandidatskaya-dissertaciya-lengert-e-v>

Автореферат разослан «__» _____ 2025 года

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор химических наук, доцент

Русанова Татьяна Юрьевна

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы.

Использование синтетических нано- и микроматериалов в биомедицине позволяет решать многофакторные задачи в условиях организма с целью изменения и контроля фармакокинетики терапевтических препаратов. Современный прогресс в научных исследованиях обеспечивает более глубокое понимание поведения наноматериалов во времени, что ставит перед учеными новые задачи и требования к материалам, усложняя их свойства и функции в контексте целевой доставки и терапии. Одной из ключевых проблем систем микроинкапсулирования является низкая специфичность их действия, решение которой требует создания многофункциональных микрообъектов. В настоящее время для решения этой проблемы предлагается использование комбинации нескольких принципов в рамках концепции тераностики, что включает высвобождение инкапсулированных веществ в ответ на эндогенные или экзогенные триггеры, специфическое нацеливание на патогенные цели в организме, анализ состава химического микроокружения на границе раздела с микроконтейнером для диагностики, а также биовизуализацию.

Для создания многокомпонентных мультифункциональных гибридных наноматериалов, отвечающих требованиям биомедицины, активно применяются методы физической химии, которые позволяют точно контролировать состав, структуру и свойства наноматериалов. В этом контексте темплатный метод представляется как перспективная стратегия получения нано- и микроматериалов, основанная на использовании временных шаблонных частиц, которые, обладая заданной формой и структурой, служат основой для формирования целевых материалов; после завершения процесса синтеза шаблоны подлежат удалению, что позволяет получить функциональные структуры с высокой степенью контролируемости морфологии и размерного распределения, что особенно важно для применения в области направленной доставки лекарственных средств. Это предполагает широкий круг задач, включая установление зависимости свойств нанокомпозитных материалов от их состава и влияние условий формирования микроконтейнеров на их характеристики. Одним из перспективных материалов для создания биосовместимых контейнеров являются нанокомпозиты, основанные на гибридных органических и неорганических материалах, состоящие из гидрогеля и неорганических наполнителей, включая наночастицы. Эти материалы обладают уникальными физико-химическими свойствами, которые могут быть адаптированы для решения конкретных терапевтических задач. Так, использование наночастиц с магнитными или оптическими свойствами может значительно улучшить отслеживание и контроль процессов доставки и высвобождения лекарств в организме.

Таким образом, дальнейшие исследования, направленные на разработку микроконтейнеров с уникальными функциональными характеристиками, способные выполнять последовательно несколько функций в ответ на внешние триггеры, представляют собой ключевой шаг к преодолению существующих ограничений в области тераностики.

Цель диссертационной работы заключалась в разработке методологии получения гибридных многофункциональных микроконтейнеров на основе альгината натрия и неорганических наночастиц, позволяющей проводить управляемое высвобождение сорбированных веществ и проводить анализ присутствия в альгинатной оболочке молекул-зондов и бактерий.

Для достижения этой цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Разработать способ получения микроконтейнеров методом темплатного синтеза, предусматривающего одновременное протекание двух физико-химических процессов: растворение частиц ватерита и формирование активных центров в полимерной матрице; исследовать термодинамические и кинетические аспекты процесса формирования структур «ядро-оболочка».
2. Исследовать возможность сорбции модельного белкового соединения (бычьего сывороточного альбумина, конъюгированного с флуоресцентным красителем) и магнитных наночастиц в оболочки гибридных микроконтейнеров; проанализировать влияние размера ядер ватерита и структуры оболочек микроконтейнеров на эффективность сорбции обоих компонентов.
3. Найти подход к дистанционному управлению целостностью микроконтейнеров посредством внешних воздействий, таких как, ультразвук и лазерное излучение; исследовать связь между составом оболочки и процессом десорбции иммобилизованных модельных веществ из оболочек гибридных микроконтейнеров при воздействии ультразвукового излучения и лазерного излучения ИК-диапазона. Оценить влияние состава оболочек микроконтейнеров и условий воздействия на кинетику десорбции при внешних воздействиях.
4. Изучить влияние наночастиц серебра в составе альгинатной матрицы на эффект комбинационного рассеяния света на поверхности микроконтейнеров для дальнейшего их применения в анализе химического состава микроокружения на границе раздела с микроконтейнером.

Научная новизна работы.

- Систематически исследовано формирование гибридных альгинатных микроконтейнеров и влияние внешних полей на десорбцию модельного соединения для дистанционного управления ими, что открывает возможности создания молекулярных технологий, ориентированных на применение в таких приоритетных направлениях, как биология, медицина и фармакология.
- Оригинальным темплатным методом получены гибридные микроконтейнеры, сочетающие биосовместимую альгинатную матрицу и неорганические наночастицы серебра. Использование высокопористых частиц карбоната кальция в качестве шаблона позволило получить материалы с контролируемой морфологией и размерами, стабильные в лиофилизированном состоянии.
- Установлена зависимость между условиями синтеза и распределением магнитных наночастиц в многослойных гибридных микроконтейнерах, что позволило создавать микроконтейнеры с настраиваемыми характеристиками.
- Установлена зависимость между количеством адсорбированных ионов серебра на шаблонных ядрах ватерита и структурой оболочек альгинатных микроконтейнеров, включая типичные дефекты двойников наночастиц серебра и изменение морфологии поверхности контейнеров.
- Установлена зависимость между параметрами внешних воздействий (ультразвуковое и лазерное излучение) на гибридные микроконтейнеры, составом оболочки и кинетикой десорбции модельных веществ. Установлено, что синтезированные наночастицы серебра *in*

situ в составе альгинатной матрицы оболочек микроконтейнеров позволяют индуцировать десорбцию высокомолекулярного соединения из альгинатных микроконтейнеров посредством воздействия ИК лазерного излучения, в том числе в условиях *in vivo* без деструктивного влияния на биологические объекты (*C. elegans*).

- Показано, что синтез наночастиц серебра с небольшими (т.е. с диапазоном расстояния между наночастицами серебра 1–5 нм) межчастичными плазмонными взаимодействиями в альгинатной матрице оболочек микроконтейнеров приводит к эффекту гигантского комбинационного рассеяния света. Это позволяет использовать такие суспензии микроконтейнеров для детектирования соединений с наличием функциональных групп (-SH, -NH₂, -COOH), способных адсорбироваться на поверхности наночастиц серебра, что показано на примере водного раствора Родамина Б в диапазоне концентраций от 0,01 до 1000 мкМ.

Практическая значимость исследования:

Предложен способ получения гибридных микроконтейнеров, альгинатная оболочка которых модифицирована наночастицами серебра *in situ*. На примере бычьего сывороточного альбумина показано, что модифицированные микроконтейнеры, состоящие из альгината натрия и наночастиц серебра, позволяют эффективно инкапсулировать белки. Продемонстрирована возможность сорбции магнитных наночастиц микроконтейнерами, что позволяет создавать структуры с контролируемым содержанием магнетита.

Установлены условия получения и состав оболочек альгинатных микроконтейнеров, при которых внешние поля (маломощная ультразвуковая стимуляция и инфракрасное излучение в первом биологическом окне прозрачности) индуцируют десорбцию модельных соединений из микроконтейнеров, обеспечивая возможность их контролируемого высвобождения для применения в доставке биологически активных веществ.

Полученный эффект усиления комбинационного рассеяния света на поверхности гибридных микроконтейнеров на основе альгината и наночастиц серебра позволяет использовать разработанные микроконтейнеры для использования в качестве платформ при анализе среды методом комбинационного рассеяния света, что открывает перспективы для анализа состава химического микроокружения путем определения широкого спектра соединений на границе раздела с поверхностью микроконтейнеров в рамках концепции тераностики. Это включает возможности определения: 1. Органических соединений: углеводороды, спирты, кислоты, аминокислоты и другие органические молекулы; 2. неорганических соединений: соли, оксиды, карбонаты и другие неорганические вещества; 3. полимеров: различные виды пластиков и синтетических материалов; 4. биологических образцов: клетки, ткани, белки, нуклеиновые кислоты и метаболиты; 5. кристаллов: минералы и кристаллические структуры.

Простота создания, а также биосовместимость компонентов, делают разработанные альгинатные контейнеры, функционализированные наночастицами серебра, потенциально привлекательным носителем для доставки лекарств. Двойная функциональность (доставка и обнаружение модельных веществ) гибридных микроконтейнеров позволяет осуществить концепцию тераностики для персонализированной медицины.

На защиту автор выносит следующие положения:

1. Растворение шаблонных частиц карбоната кальция аскорбиновой кислотой, покрытых альгинатом натрия в присутствии раствора нитрата серебра, приводит к гелеобразованию альгинатной оболочки с одновременным зародышеобразованием наночастиц серебра в альгинатной матрице.
2. Синтез наночастиц серебра из ионов непосредственно в альгинатной оболочке способствует усилению эффекта комбинационного рассеяния света на поверхности гибридных альгинатных микроконтейнеров.
3. Воздействие ультразвука с частотой 35 кГц и плотностью мощности выше 0,64 Вт/см² на гибридные микроконтейнеры инициирует появление дефектов оболочки, что увеличивает десорбцию инкапсулированного в них модельного конъюгата ТРИЦ-БСА.
4. Воздействие лазерного излучения с длиной волны 785 нм и мощностью лазера 15 мВт на альгинатные микроконтейнеры, модифицированные наночастицами серебра, в условиях *in vivo* способствует увеличению десорбции инкапсулированного в них модельного конъюгата ТРИЦ-БСА из оболочки контейнера.

Личный вклад автора состоит в самостоятельной постановке задач и выполнении представленных в диссертации экспериментальных исследований. Анализ литературы по соответствующей тематике, характеристика образцов комплексом инструментальных методов, а также систематизация и интерпретация экспериментальных данных, написание научных статей были проведены автором.

Публикации. Опубликовано 17 работ, включая 9 статей в журналах, входящих в перечень ВАК и библиографические базы данных Web of Science и Scopus.

Степень достоверности подтверждается применением комплекса современных методов исследования, использованием современного научного оборудования, верифицированного по международным стандартам, обеспечением единства измерений, статистической обработкой результатов и высокой сходимостью результатов исследований, полученных методами, основанными на различных физико-химических принципах.

Структура и объем работы обусловлены поставленной целью и сформулированными задачами исследования, а также требованиями, предъявляемыми к диссертационным работам. Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения и списка использованных источников. Общий объем диссертации составляет 111 страниц, включая 25 рисунка и 3 таблицы.

Финансовая поддержка. Работы осуществлялась в рамках следующих проектов:

Правительства Российской Федерации (Грант № 14. Z50.31.0004 для поддержки реализуемых научно-исследовательских проектов под руководством ведущих ученых российских институтов и российские вузы) и Российского фонда фундаментальных исследований (НИЦ РФФИ № 15-29-01172 офи_м). Стипендии президента РФ обучения за рубежом в 2016/2017 году. Гос. задания ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского» Минздрава России (проект №

121032500024-2). Российского фонда фундаментальных исследований по научному проекту № 17-33-50080. Минобрнауки РФ в рамках государственного задания (проект № ФССР-2020-0002). Грант российского научного фонда № 22-73-10032 «Лекарственные носители с обратной рН-чувствительностью и способностью к быстрому высвобождению как альтернативный путь доставки лекарств».

Методология и методы исследования.

Характеризацию морфологии частиц и оболочек проводили с использованием изображений, полученных с помощью сканирующей, просвечивающей и конфокальной микроскопии. Измерения СЭМ проводили с помощью MIRA II LMU (Tescan) при рабочем напряжении 30 кВ, в режиме второго электрона и обратного рассеяния электронов. Увеличение варьировалось от 100 до 40 000 раз. Образцы готовили путем высушивания капли водной суспензии образцов на кремниевой пластине. Распределение частиц карбоната кальция, а также микроконтейнеров по размерам получали путем постобработки и анализа изображений микрофотографий СЭМ с помощью программного обеспечения ImageJ (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), Gwyddion и CorelDraw (не менее 100 измерений на образец). Флуоресцентную визуализацию полых оболочек альгината серебра, нагруженных ТРИЦ-БСА, осуществляли с помощью флуоресцентного конфокального лазерного сканирующего микроскопа TCS SP8 (Leica, Германия). В процессе подготовки образцов к визуализации 5 мкл каждого образца, окрашенного конъюгацией ТРИЦ-БСА, помещали на покровное стекло. Флуоресценцию TRITC детектировали при длинах волн 565 нм и 620 нм, используя длину волны возбуждения 552 нм. Спектр комбинационного рассеяния света получали в каждой точке сканируемой области с помощью конфокального рамановского микроскопа WITec Alpha300R+ с использованием диодного лазера возбуждения 785 нм (Toptica, Германия) и спектрометра UHTS 300 с охлаждаемой ПЗС-камерой -70 °C (iDus 401 BR-DD, ANDOR), Великобритания). Мощность лазера, измеренная перед объективом, составила 165 мВт, время интегрирования — 1 с на точку, объектив 100х/0,9 NA (Nikon, Япония). Полученный набор данных предварительно обрабатывали в программе R. 35. Коррекцию фона выполняли с помощью алгоритма взвешенной регрессии с ограничениями по 3-й производной, реализованного в базовом пакете для программы R. Также, в работе использовали методы электрофоретического рассеяния света, рамановской спектроскопии и метод спектрофотометрии. Рентгенограммы порошков карбоната кальция, и микроконтейнеров получали на дифрактометре Xcalibur/Gemini с использованием Cu-K α -излучения. Ускоряющее напряжение и приложенный ток составляли 40 кВ и 40 мА. Дзета-потенциал суспензии наночастиц измеряли методом усреднение 10 повторов по данным, полученным с помощью Zetasizer Nano-Z (Malvern Instruments Ltd, Великобритания). Оптический микроскопический анализ выполняли с помощью Leica TCS SP. инвертированный конфокальный сканирующий микроскоп (Leica, Германия) с масляным иммерсионным объективом 100/1,4–0,7. Скорость перемещения полученных микроконтейнеров измеряли методом фотоседиментометрии. Суспензию капсул в воде заливали в прозрачную кювету, затем измеряли интенсивность луча полупроводникового лазера с длиной волны 660 нм, расположенного параллельно границе раздела воздух/вода, на пропускание. В зависимости от концентрации нитрата серебра скорость перемещения микроконтейнеров ко дну кюветы изменялась. Рассчитывали среднюю скорость перемещения в соответствии с уравнением: $v_i = St_i$, где S - расстояние между стенкой кюветы и лазером, t_i - время перемещения, v_i - скорость перемещения, а i- номер образца.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во Введении обоснована актуальность проведенных исследований, сформулированы основные цели и задачи, описана научная новизна и практическая значимость полученных результатов, а также сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

В Главе 1 представлен аналитический обзор литературы по теме диссертации. В обзоре подробно рассмотрены методы получения, характеристики и применения наночастиц серебра, магнитных наночастиц, различных контейнеров из альгината натрия. Описаны методы и используемые носители для адресной доставки биологически активных веществ, рассмотрено применение ультразвукового и лазерного воздействий на различные контейнеры. Отдельно рассмотрено использование нематоды (*C. elegans*) в качестве стандартных модельных организмов для тестов *in vivo*.

В Главе 2 описаны подходы к формированию структур ядро-оболочка путем адгезии альгината натрия к поверхности микроразмерных частиц карбоната кальция. Далее описан способ получения полых микроконтейнеров, состоящих из органической биосовместимой альгинатной матрицы и неорганических наночастиц серебра, на основе полученных структур ядро-оболочка с использованием темплатного синтеза с помощью растворения ядра карбоната кальция; результатом является зародышеобразование наночастиц серебра в альгинатной матрице. Описаны подходы к иммобилизации биологически активных веществ и магнитных наночастиц в микроконтейнеры, зависимости физико-химических свойств гибридных контейнеров от условий их получения, состава и структуры оболочки, проведена оценка коэффициента усиления сигнала гигантского комбинационного рассеяния на поверхности гибридных микроконтейнеров.

Многофункциональные контейнеры получали адсорбцией альгината натрия на пористые частицы карбоната кальция с последующим гелеобразованием альгината натрия ионами серебра при добавлении нитрата серебра. Восстановление ионов серебра до наночастиц в матрице альгината и одновременное удаление ядра карбоната кальция (CaCO_3) осуществлялось добавлением раствора аскорбиновой кислоты ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) (Рисунок 1). При этом нитрат серебра предварительно загружали в ядра карбоната кальция путем процедуры сорбции из раствора.

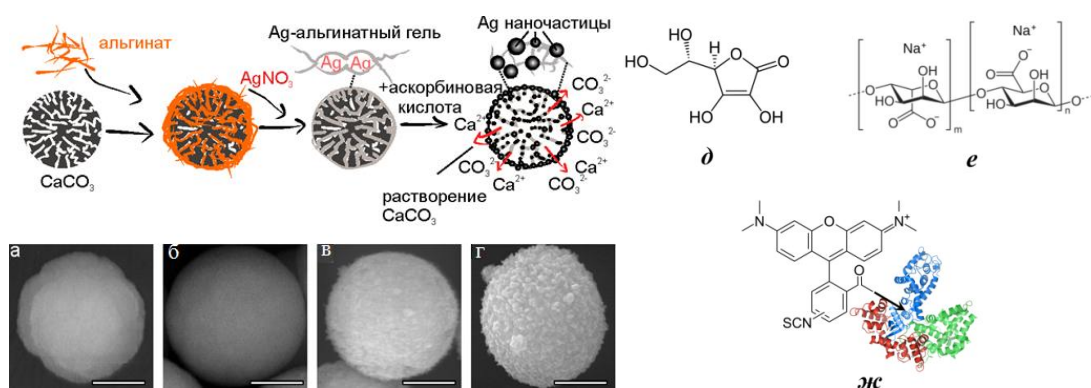


Рисунок 1. Схема получения контейнеров, состоящих из альгинатной матрицы и наночастиц серебра. СЭМ - изображения соответствуют: CaCO_3 (а); CaCO_3 после сорбции альгината натрия (б); CaCO_3 -ядра после адсорбции альгината натрия и нитрата серебра (в); полая модифицированная структура (г), состоящая из альгината натрия и наночастиц серебра.

Масштабные линейки соответствуют 1 мкм. Структурные формулы: аскорбиновой кислоты (д); альгината натрия (е); бычьего сывороточного альбумина, конъюгированного с флуоресцентным красителем (ТРИЦ-БСА) (ж).

Для изучения влияния присутствия и локализации наночастиц магнетита на размер, форму и морфологию гидрогелевых микроконтейнеров синтезировали образцы с различной структурой оболочки микроконтейнеров (**Таблица 1**). Магнитные наночастицы (МНЧ) в микроконтейнеры вводили двумя способами: соосаждением в ядра CaCO_3 и сорбцией в оболочки (в некоторых случаях использовались оба метода в сочетании). Концентрацию МНЧ, включенных в оболочки микроконтейнеров, оценивали методом фотометрического титрования, при котором интенсивность окраски раствора соответствует концентрации ионов Fe^{3+} из-за их взаимодействия с роданид-ионами – SCN^- .

Таблица 1. Структура и размеры приготовленных образцов микроконтейнеров. Ag^+ представляет собой восстановленное серебро. АЛГ- слои альгината натрия на поверхности микроконтейнера.

№	Сорбция наночастиц магнетита в ядра CaCO_3	Слои оболочки микроконтейнера	Размер микроконтейнера, мкм	Fe_3O_4 (МНЧ) содержание на образец (40 мг частиц CaCO_3), мг	PDI
0	Без МНЧ	АЛГ/ Ag^+	3.9 ± 0.5	0	0,35
1	МНЧ (адсорб)	АЛГ/ Ag^+	4.6 ± 0.4	0.32 ± 0.06	0,42
2	-	АЛГ/МНЧ/ Ag^+	4.8 ± 0.3	0.56 ± 0.09	0,44
3	-	АЛГ/ Ag^+ /МНЧ	4.1 ± 0.7	0.89 ± 0.28	0,37
4	МНЧ	АЛГ/ Ag^+	5.2 ± 0.6	1.16 ± 0.15	0,46
5	МНЧ	АЛГ/МНЧ/ Ag^+	6.8 ± 0.8	1.71 ± 0.06	NA
6	МНЧ	АЛГ/ Ag^+ /МНЧ	6.9 ± 0.9	1.79 ± 0.09	NA

NA – (Not Available) — обозначение отсутствия или недоступности результата измерения, возникающее, когда прибор не может корректно обработать данные из-за физических ограничений (например, оседание крупных частиц) или технических проблем во время эксперимента.

При сборке микроконтейнеров проводили измерения ζ -потенциала (результаты измерений ζ -потенциала представлены в **Таблице 2**) методом динамического рассеяния света. ζ -потенциал микроконтейнеров после адсорбции всех слоев был отрицательным, что подтверждает химическое связывание между компонентами слоев. Отрицательный ζ -потенциал обусловлен присутствием карбоксильных групп на поверхности альгината, которые могут связываться с положительными ионами железа. При синтезе микроконтейнеров в кислой среде (pH 4–5) происходит частичное растворение магнетита, и высвобожденные ионы Fe^{3+} хелатируются карбоксильными группами альгината, формируя стабильные комплексы (**Таблица 1**).

Таблица 2. ζ -потенциал после каждого этапа синтеза.

Структура оболочки микроконтейнера	ζ – потенциал, мВ	Станд. откл., мВ ($\pm$)
Ядра CaCO_3	-2.31	0.8
CaCO_3 /АЛГ	-19.6	6.4
CaCO_3 /АЛГ/(раствор AgNO_3)	-26.2	1.3
АЛГ/ Ag^+	-18.8	0.5
CaCO_3 / МНЧ	-19.5	1.8
CaCO_3 /МНЧ/АЛГ	-27.4	0.1
CaCO_3 /АЛГ/ МНЧ/ (раствор AgNO_3)	-24.3	7.4

Микроструктуру контейнеров изучали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ/СТЭМ). Обнаружили, что размеры микроконтейнеров и скорость их агрегации возрастали при увеличении количества введенных МНЧ. Типичные ПЭМ/СТЭМ-изображения микроконтейнеров (образцы: № 0 – контрольный образец, без наночастиц магнетита в оболочке/ядре и микроконтейнеры № 3- АЛГ/Ag⁺/МНЧ – представлены **Рисунке 2**.

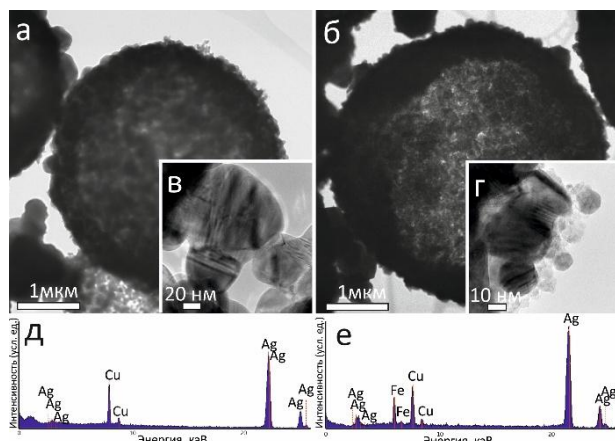


Рисунок 2. Гибридные микроконтейнеры для образцов № 0 (а,в) и № 3 (б,д): (а,б) – изображение СТЭМ в светлом поле, (б,г) – изображения ПЭМ ВР. Соответствующие результаты анализа ЭДС для обоих образцов представлены на панелях (д) и (е).

Данные СТЭМ, ПЭМ ВР и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС) указывают на присутствие частиц, содержащих Fe, на поверхности наночастиц серебра (**Рисунок 2 в,г**).

Зависимости массы сорбированных наночастиц магнетита и размера получаемых микроконтейнеров от способа сорбции, представленные в **Таблице 1**, свидетельствуют, что размер микроконтейнеров постепенно увеличивается с увеличением содержания наночастиц магнетита. Так, при сорбции наночастиц магнетита внутренней поверхностью оболочек микроконтейнеров посредством шаблонного ядра, приводит к увеличению среднего размера микроконтейнеров на 77%, по сравнению с конфигурацией оболочек без магнетита, размер которых составляет $3,9 \pm 0,5$ мкм, с учетом средней погрешности в 10%. Возрастание размера и массы микроконтейнеров с соответствующей потерей седиментационной устойчивости представляет проблему для дальнейших биомедицинских применений (**Таблица 1**).

Для изучения влияния шаблона/ядра CaCO₃ на свойства полученных контейнеров, использовали частицы карбоната кальция различных размеров, синтезированные тремя методами: при механическом перемешивании с помощью магнитной мешалки, при перемешивании с помощью ультразвука и путем увеличения вязкости дисперсионной среды (в растворе этиленгликоля) с размерами частиц 3.0 ± 0.3 мкм, 1.0 ± 0.2 мкм и 0.8 ± 0.1 мкм (**Рисунок 3 а-в**). Размер ядер CaCO₃, определяет размеры получаемых альгинатных контейнеров модифицированных наночастицами серебра, что позволяет контролировать размер на этапе синтеза (**Рисунок 3 г-е**). Для демонстрации эффективности и функциональности полученных контейнеров, проводили сорбцию бычьего сывороточного альбумина, конъюгированного с флуоресцентным красителем (ТРИЦ-БСА) (**Рисунок 3 ж**), в качестве модельного соединения (**Рисунок 3 ж-и**).

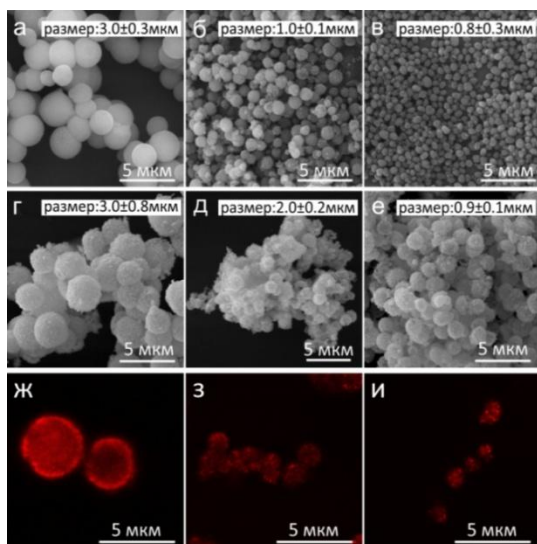


Рисунок 3. СЭМ-изображения частиц CaCO_3 (а-в), синтезированных различными методами: при механическом перемешивании с помощью магнитной мешалки (а), при перемешивании с помощью ультразвука (б) и в среде этиленгликоля (в). Полые альгинатные контейнеры, синтезированные на основе соответствующего шаблона частиц CaCO_3 (г-е). Изображения контейнеров различных размеров, полученные методом конфокальной микроскопии (ж-и).

Изображения сканирующей просвечивающей электронной микроскопии (Рисунок 4 а, б) показывают, что в результате восстановления ионов серебра в альгинатной

матрице формируются оболочки контейнеров содержащие наночастицы серебра. Средний размер и количество наночастиц серебра, приходящихся на единицу площади оболочки микроконтейнера (плотность наночастиц), образованных в альгинатной матрице, определяются количеством загруженного в ядра CaCO_3 нитрата серебра.

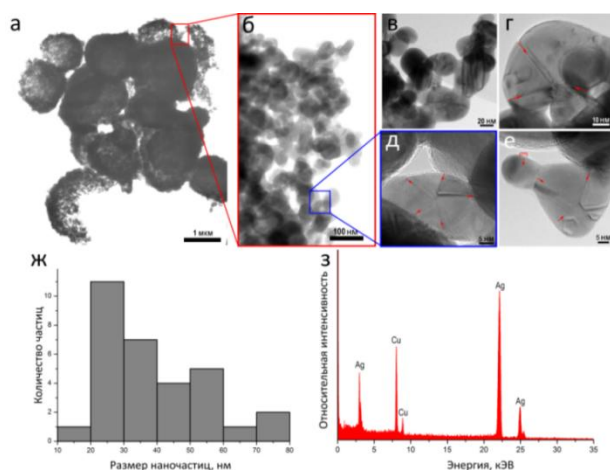


Рисунок 4. Изображения СТЭМ контейнеров, состоящих из альгината натрия и наночастиц серебра при различных увеличениях: обзорное светлопольное изображение полых контейнеров (а), увеличенное светлопольное изображение наночастиц серебра (б). Изображения просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения наночастиц серебра на оболочке контейнеров при различных увеличениях, красные стрелки указывают плоскости двойникования, параллельные плоскостям $\{111\}$ кристаллов (в – е), распределение наночастиц серебра по

размерам (ж), оцененное по изображениям (б, в), результаты энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии контейнеров (з).

Низкие концентрации соли нитрата серебра (0,1 М для сорбции) приводят к формированию частиц с низкой плотностью в оболочке и низкой плотностью дефектов двойников, а высокая концентрация нитрата серебра (1,25 М) к образованию «игольчатых» структур на поверхности альгинатных оболочек (Рисунок 5), что, согласно литературным данным, оказывает деструктивное действие на биологические клетки, которое может нарушить функцию микроконтейнеров.

В качестве оптимального количества нитрата серебра выбрали концентрацию 0,75 М, при которой средний размер наночастиц серебра в полученной гибридной оболочке составляет 35 ± 9 нм (Рисунок 4 ж). При данной концентрации нитрата серебра обнаружили высокую плотность двойников (Рисунок 4 г-е) в наночастицах, которые являются типичными дефектами наночастиц серебра с гранецентрированной кубической решёткой.

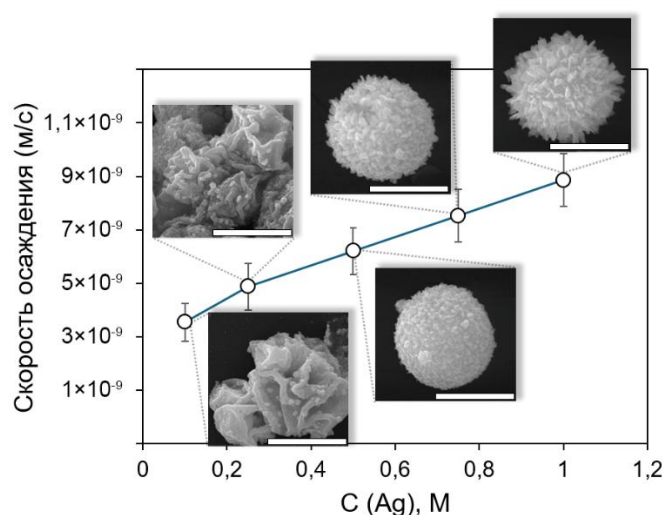


Рисунок 5. Зависимость скорости осаждения микроконтейнеров в воде от концентрации нитрата серебра в шаблонных ядрах ватерита, шкала 3 мкм.

Исследование стабильности гибридных микроконтейнеров проводили в условиях инкубации при физиологических условиях (PBS, 37 °C) в течение 24 часов. Микроконтейнеры продемонстрировали сохранение структурной целостности, формы и размера микроконтейнеров, однако зафиксировали явление агрегации микроконтейнеров (**Рисунок 6**).

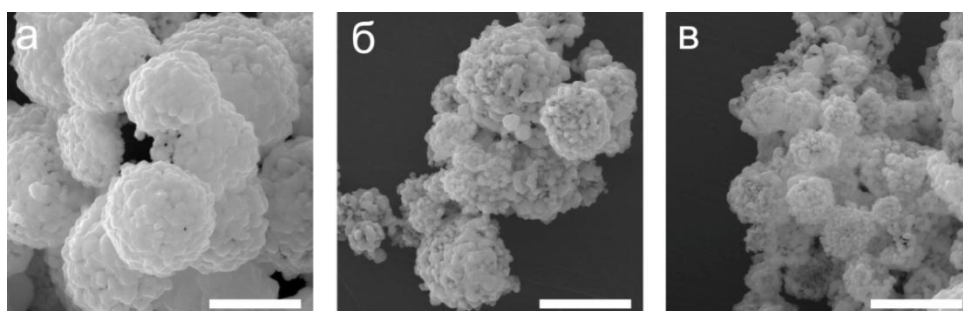


Рисунок 6. Изображения сканирующей электронной микроскопии гибридных микроконтейнеров после 24 часов инкубации в буфере PBS при 37 °C: (а) 3.0 ± 0.8 мкм; (б) 2.0 ± 0.2 мкм; (в) 0.9 ± 0.1 мкм. Масштабные линии соответствуют 2 мкм.

Проводили измерения спектров комбинационного рассеяния для контейнеров различных размеров. Коэффициент усиления субстрата комбинационного рассеяния (SSEF) определялся путем маркировки контейнеров 4-нитрофенолом. Усредненные спектры комбинационного рассеяния 4-нитрофенола на поверхности гибридных контейнерах показаны на **Рисунке 7**.

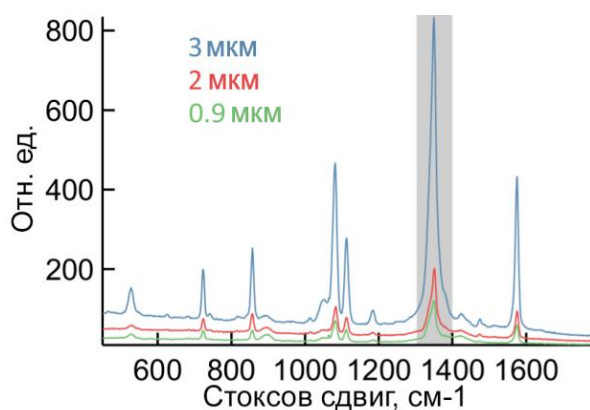


Рисунок 7. Спектры комбинационного рассеяния 4-нитрофенола, полученные с поверхности контейнеров различных размеров. Пик 1339 см^{-1} , используемый для расчета коэффициента усиления, выделен серым цветом. Каждый спектр является средним по различным кластерам контейнеров.

Коэффициент усиления подложки (SSEF) вычисляли, как отношение интенсивности Стоксового рассеяния, приходящегося на одну молекулу, найденного методом комбинационного рассеяния, к стандартными объемным измерениям методом комбинационного рассеяния на той же молекуле:

$$SSEF = \frac{I_{SERS}P_{Raman}}{I_{Raman}P_{SERS}} \times \frac{N_{Raman}}{N_{SERS}} = \frac{I_{SERS}P_{Raman}}{I_{Raman}P_{SERS}} \times \frac{H_{eff}}{\rho\mu_{Ag}}$$

В данном случае интенсивности пересчитывали с учетом разницы в мощности накачки лазера при получении спектров (P_{Raman} и P_{SERS}). Эталонный спектр объемного раствора молекул измеряли в конфокальном объеме с эффективной высотой H_{eff} 160 мкм и концентрацией с 3×10^{25} частиц/м³. Количество молекул, вносящих вклад в сигнал комбинационного рассеяния, определяли поверхностной плотностью молекул ρ , равной приблизительно $4,4 \times 10^{18}$ частиц/м², и площадью проекции поверхности серебряной оболочки μ_{Ag} , равной 2,8 мкм² (согласно изображениям, полученным с помощью микроскопа ПЭМ).

Данные комбинационного рассеяния анализировали на основе пика 1339 см⁻¹, после чего вычисляли коэффициент усиления в диапазоне 10^4 - 10^5 для всех типов микроконтейнеров (**Рисунок 8**), который коррелирует с литературными данными.

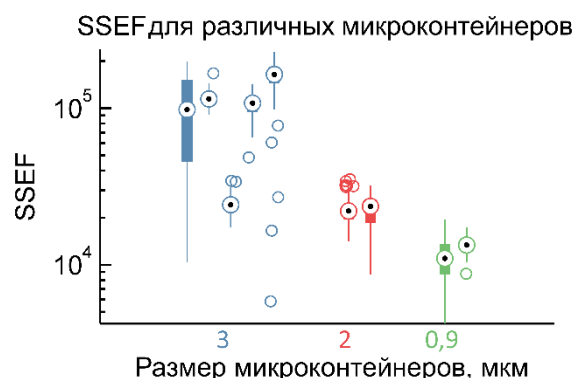


Рисунок 8. SSEF, рассчитанный для контейнеров различного размера, показывающий значение 10^4 – 10^5 . Каждый столбец представляет несколько точек, измеренных на отдельном кластере микроконтейнеров.

Полученную погрешность при определении коэффициентов усиления, показанную на рисунке 8, можно объяснить неоднородными, самособирающимися агрегатами/кластерами

микроконтейнеров (высокий индекс полидисперсности), использованных для получения спектров комбинационного рассеяния. Так, микроконтейнеры размером $3,0 \pm 0,8$ мкм характеризуются коэффициентом полидисперсности 0,35, в то время как для микроконтейнеров размером 0,9 мкм он составляет 0,32.

Для каждого набора микроконтейнеров спектры комбинационного рассеяния получали, по меньшей мере, в двух картах размером 40×40 мкм с разрешением 10×10 пикселей.

Микроконтейнеры размером $3,0 \pm 0,8$ мкм проявляют самое высокое изменение коэффициента усиления в сравнении с микроконтейнерами других размеров. Это объясняется более равномерным распределением наночастиц серебра в наиболее крупных альгинатных контейнерах, что обеспечивает оптимальное расстояние между наночастицами серебра. Но увеличение количества областей неоднородности, характерных для наиболее крупных частиц, приводит к увеличению дисперсии сигнала комбинационного рассеяния. Использование ионов серебра в качестве структурных элементов для наночастиц серебра, полученных с помощью синтеза *in situ* на поверхности альгинатных оболочек, позволяет получать контейнеры с однородным распределением наночастиц серебра в их оболочках и достигать оптимального расстояния между наночастицами серебра, что позволяет усилить рамановский сигнал до 10^5 .

На следующем этапе исследовали влияние синтезированных в альгинатной матрице серебряных частиц на эффект комбинационного рассеяния света для детектирования веществ в суспензии на примере модельного красителя Родамин – Б, а также на примере обнаружения в среде бактерий *E. coli* посредством данного эффекта.

Высокое содержание наночастиц серебра в альгинатных контейнерах позволило обнаружить флуоресцентный краситель Родамин - Б получением спектров комбинационного рассеяния на поверхности контейнеров размером 3 мкм.

На **рисунке 9** представлены спектры Родамина – Б (RhoB) концентрацией 1000мкМ и контейнеры без красителя (Alg-Ag), полученные с поверхности микроконтейнеров. Все спектры ГКР получали с помощью лазера с длиной волны 785 нм и мощностью 0,03 МВт, минимум с поверхности 10 контейнеров. Интенсивные пики 1358 см^{-1} , 1507 см^{-1} , 1530 см^{-1} , 1648 см^{-1} соответствуют спектру красителя Родамина–Б.

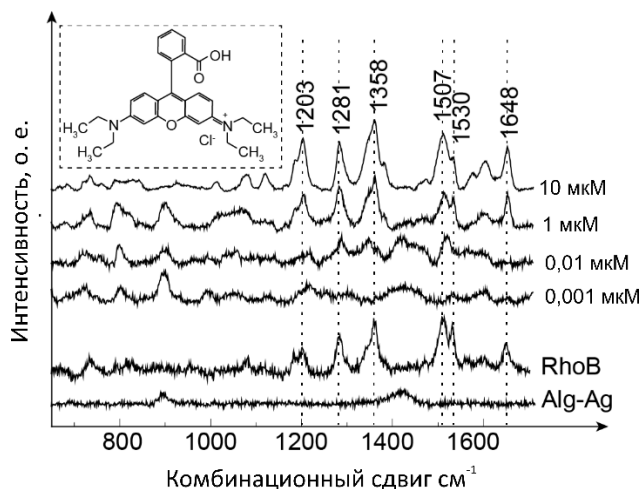


Рисунок 9. Спектры ГКР, полученные с поверхности гибридных контейнеров.

Сделан вывод, что гибридные микроконтейнеры обеспечивают усиление сигнала ГКР за счет присутствующих в их составе наночастиц серебра, что обеспечивает чувствительность системы даже к низким концентрациям красителя и позволяет получить ГКР - сигнал для Родамина – Б в концентрации 0,01 мкМ. Пики альгината можно увидеть в образце с высоким содержанием Родамина – Б, которые не перекрываются красителем в области 1200 см^{-1} и 1600 см^{-1} . Стоит отметить, что в спектрах ГКР отсутствуют пики CaCO_3 , что указывает на полное удаление ядер карбоната кальция в образце.

Для оценки практического применения разработанной структуры в качестве диагностического средства проводили эксперименты по обнаружению микроорганизмов в растворе на примере модельных бактерий кишечной палочки (*E. coli*). Спектры ГКР, показывающие химическую сигнатуру бактерии представлены на **Рисунке 10 а**. Два интенсивных пика при 733 см^{-1} и 1334 см^{-1} относятся к производным флавина, либо к другим молекулам, содержащим аденин. Пик 1373 см^{-1} относится к молекулам ДНК, пик 625 см^{-1} отнесен к химическим группам COO^- . Пик при 1450 см^{-1} обусловлен липидами.

Суспендирование гибридных микроконтейнеров и бактерий *E. coli*, может приводить к их взаимодействию и связыванию, в результате чего бактерия может быть связана с несколькими микроконтейнерами. Связь между бактериями и микроконтейнерами обусловлена пористой структурой оболочки микроконтейнеров. Эти факторы могут способствовать быстрому определению бактерий по их сигнатурам без использования каких-

либо меток. Карта интенсивности комбинационного рассеяния на пике 733 см^{-1} показывает наличие сигнатур аденина на поверхности бактерий (**Рисунок 10 б** вставка).

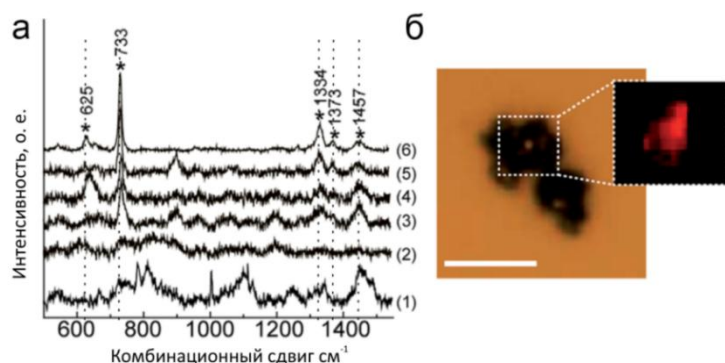


Рисунок 10. Спектры ГКР модельных бактерий штамма *E. coli*, полученные в присутствии микроконтейнеров (спектры 3-6) (а); контрольный спектр комбинационного рассеяния *E. coli* (1); спектр (2) соответствует комбинационному рассеянию гибридных контейнеров в фосфатно-солевом буферном растворе; Оптическое изображение гибридных микроконтейнеров (б). Вставка

показывает карту интенсивности комбинационного рассеяния (полученную на длине волны 733 см^{-1}) гибридного микроконтейнера (пунктирная линия показывает отснятый участок). Масштабная линейка соответствуют 10 мкм.

Синтез наночастиц серебра *in situ* в альгинатной матрице, формирующей оболочку микроконтейнеров, позволил зафиксировать усиление эффекта комбинационного рассеяния света на их поверхности, что способствовало детектировать методом КР-спектроскопии модельный зонд - Родамин Б в водном растворе в диапазоне концентраций от 0,01 до 1000 мкМ.

В **Главе 3** рассматривается влияние состава и структуры альгинатной оболочки микроконтейнеров на кинетику десорбции модельного соединения, загруженного в них, при воздействии ультразвука и лазерного облучения различной мощности.

Исследовали возможность контролируемой десорбции инкапсулированного вещества с помощью маломощной ультразвуковой (УЗ) стимуляции. УЗ-воздействию подвергали суспензии контейнеров, нагруженных флуоресцентным конъюгатом ТРИЦ-БСА. Исследовали кинетику разрушения контейнеров с целью десорбции конъюгата при помощи ультразвуковой ванны в течение различных промежутков времени (от 1 до 180 минут) на частоте 35 кГц и плотности мощности $0,64\text{ Вт/см}^2$. Исследовали два параметра в зависимости от размера шаблона ядер карбоната кальция, использованного для синтеза гибридных микроконтейнеров:

- (1) доля десорбированных молекул ТРИЦ-БСА в надосадочной жидкости;
- (2) процент разрушенных контейнеров (**Рисунке 11**).

Для оценки влияния ультразвукового воздействия на образцы, сравнивали контейнеры, подверженные ультразвуковому воздействию и контрольные микроконтейнеры, без ультразвукового воздействия (в качестве контрольного образца была взята суспензия контейнеров размером $3.0 \pm 0.8\text{ мкм}$). Контрольная суспензия контейнеров была стабильна в течение 3 ч, десорбция флуоресцентного конъюгата ТРИЦ-БСА составила не более 6% с константой скорости десорбции $0,0136\text{ ч}^{-1}$. Такая кинетика соответствует самопроизвольной десорбции молекул конъюгата через гибридные оболочки.

Измерения концентрации молекул ТРИЦ-БСА в надосадочной жидкости показали, что УЗ-воздействие приводит не только к разрушению контейнеров, но и повышению скорости десорбции молекул ТРИЦ-БСА. В этом случае, выход инкапсулированных молекул ТРИЦ-

БСА при ультразвуковом воздействии на суспензию гибридных микроконтейнеров размером 3.0 ± 0.8 составил 18% от общей массы инкапсулированного в образце конъюгата, что соответствует 20% разрушенных контейнеров. В течение 3 часов УЗ-воздействия число разрушенных контейнеров составило 99%. Однако, количество десорбированных молекул флуоресцентного конъюгата в надосадочной жидкости не увеличивается, потому что эксперимент проводился в объеме, близком к 1 мл, и высвободившийся белок адсорбировался обратно на кусочки разрушенных оболочек микроконтейнеров.

Короткое время воздействия УЗ (менее 10 мин) не приводило к значительным морфологическим изменениям оболочек микроконтейнеров в суспензии. Морфологические изменения, обусловленные воздействием ультразвука, в суспензиях микроконтейнеров размером 3.0 ± 0.8 мкм выше, чем в суспензиях микроконтейнеров меньших размеров (2.0 ± 0.2 и 0.9 ± 0.1 мкм), что указывало на более высокую устойчивость таких микроконтейнеров к действию ультразвука. После 30 минут УЗ-воздействия образцы с наибольшим размером были полностью разрушены (**Рисунок 11 а**).

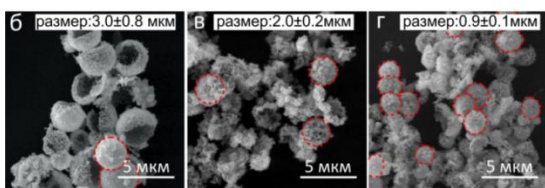
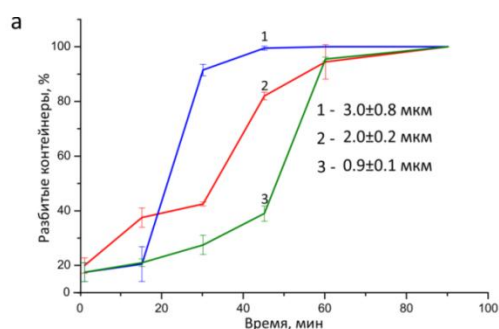


Рисунок 11. Зависимость количества разрушенных контейнеров различных размеров (1) 3.0 ± 0.8 мкм, (2) 2.0 ± 0.2 мкм, и (3) 0.9 ± 0.1 мкм от времени ультразвуковой обработки (частота 35 кГц и плотность мощности $0,64 \text{ Вт/см}^2$) (а). Изображения СЭМ полых серебряных альгинатных контейнеров различных размеров (б-г): 3.0 ± 0.8 мкм (б), 2.0 ± 0.2 мкм (в) и 0.9 ± 0.1 мкм (г) после ультразвукового воздействия. Длительность процедуры составляет 60 мин. Красными пунктирными линиями обозначены контейнеры, не подвергавшиеся УЗ-воздействию.

Высокая подверженность микроконтейнеров размера 3.0 ± 0.8 мкм к действию ультразвукового излучения может быть объяснена высокой неоднородностью их оболочки. При добавлении аскорбиновой кислоты во время синтеза, происходило истончение оболочки контейнеров, что приводило к разрыву самого тонкого участка стенки и быстрому разрушению контейнера при УЗ-воздействии (**Рисунок 11 б**). Гибридные контейнеры размером 0.9 ± 0.1 мкм стабильны под воздействием ультразвука, поскольку имеют равномерное покрытие серебра на альгинатной оболочке (**Рисунок 11 г**).

Таким образом, на основании исследования физико-химических свойств полученных микроконтейнеров установили, что воздействие ультразвука частотой 35 кГц и плотностью мощности $0,64 \text{ Вт/см}^2$ на суспензии альгинатных микроконтейнеров, модифицированных наночастицами серебра в течение 60 мин приводило к нарушению целостности оболочек микроконтейнеров с эффективностью, зависимой от их размера, и десорбированию инкапсулированного в них модельного конъюгата ТРИЦ-БСА, из оболочки микроконтейнера.

Для исследования влияния серебряных наночастиц в составе оболочки микроконтейнеров на высвобождение конъюгата под действием лазерного излучения, отдельные гибридные микроконтейнеры на поверхности пластины агар-агара подвергали лазерному облучению различной мощности. Воздействие лазерного облучения (с длиной волны 785 нм, время воздействия 10 с) на контейнеры, загруженные конъюгатом ТРИЦ-БСА, приводило к значительному снижению флуоресцентного сигнала, как при 5 мВт, так и при 15 мВт (**Рисунок 12**). Светлопольная микроскопия выявила различия в размерах «ударных

кратеров», т.е. углублений, появившихся на пластине с агар-агаром после воздействия импульсов лазера мощностью 5 мВт (25 мкм) и 15 мВт (39 мкм). Эффект образования кратеров может быть объяснен нагреванием агар-агара посредством теплообмена через контейнер, при чем этот эффект усиливается при более высокой мощности лазера. На основе уменьшения интенсивности сигнала флуоресценции (красная линия, **Рисунок 12 е, м**) сделали предположение, что мощности 5 мВт и 15 мВт удовлетворяют необходимые и достаточные условия для высвобождения инкапсулированного модельного вещества.

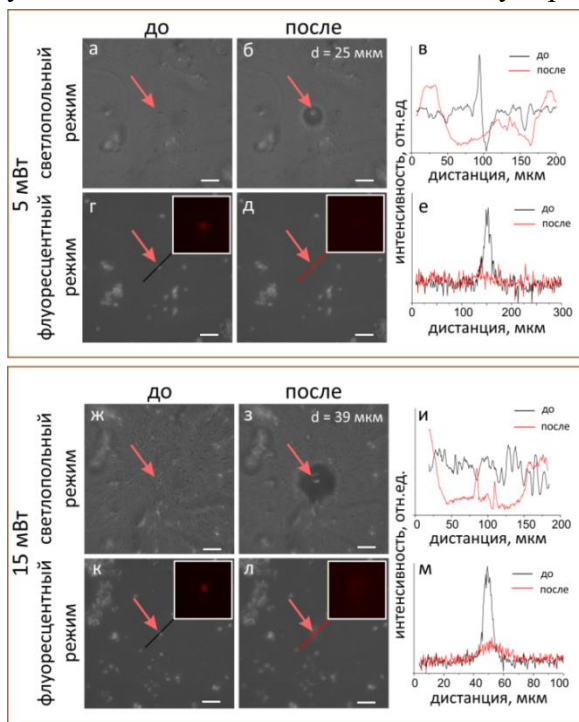


Рисунок 12. Изображения в режимах светопольной (а, б, ж, з) и флуоресцентной (г, д, к, л) микроскопии контейнеров на пластине агар-агара до (а, б, ж, к) и после (и, д, з, л) обработки лазером, с интенсивностями 5 мВт и 15 мВт, соответственно. Соответствующие профили вдоль линий, изображенных в (г, д, к, л), представлены в (в, е, и, м). Масштабные линейки соответствуют 20 мкм.

На основании исследования физико-химических свойств полученных микроконтейнеров установили, что воздействие электромагнитного излучения в ближней инфракрасной области спектра (что показано на длине волны 785 нм) приводит к нарушению целостности их оболочек.

Глава 5 посвящена исследованию влияния состава и структуры альгинатных микроконтейнеров на кинетику высвобождения загруженных молекул конъюгата ТРИЦ-БСА под действием лазерного излучения в условиях *in vivo* на примере многоклеточных живых организмов *C. elegans*.

В данной главе продемонстрировано применение дистанционного высвобождения флуоресцентного конъюгата ТРИЦ-БСА в нематоде *Caenorhabditis elegans* с использованием лазерного света в ближнем инфракрасном диапазоне в качестве триггера. Для этих целей выбрали оптимальный размер носителей, предназначенных для визуализации в условиях *in vivo* и обеспечения их проникновения в биологические системы, с использованием нематоды *C. elegans*. Разработанный тип гибридных микроконтейнеров отличается способностью к длительному хранению в лиофилизированном состоянии, что позволяет нематодам поглощать микроконтейнеры в стандартных условиях культивирования на воздухе.

В качестве образцов использовали гибридные контейнеры размером 3.0 ± 0.8 мкм и 0.9 ± 0.1 мкм. Для начала синтезировали микрочастицы карбоната кальция с конъюгатом ТРИЦ-БСА — биологически значимым питательным веществом для клеточных и микробных культур, использованным в данной работе в качестве модели для *in vivo* высвобождения. Сорбция конъюгата ТРИЦ-БСА в микроконтейнеры составила $40 \pm 0,14\%$ (вес) для частиц размером 3.0 ± 0.8 мкм ($\zeta = -30 \pm 0,8$ мВ) и $39 \pm 0,44\%$ (вес) для частиц размером $0,8$ мкм ($\zeta = -20 \pm 1,6$ мВ). Константа скорости десорбции конъюгата ТРИЦ-БСА из микроконтейнеров в водном растворе составила $0,0136 \text{ ч}^{-1}$ после 3 часов инкубации. После 24 часов константа

скорости десорбции конъюгата составила 0,0093 (**Рисунок 13**). При сокращении количества серебра, адсорбированного на ядре микроконтейнеров при их получении, скорость константы десорбции конъюгата из микроконтейнеров возрастает, что связано с истончением оболочки.

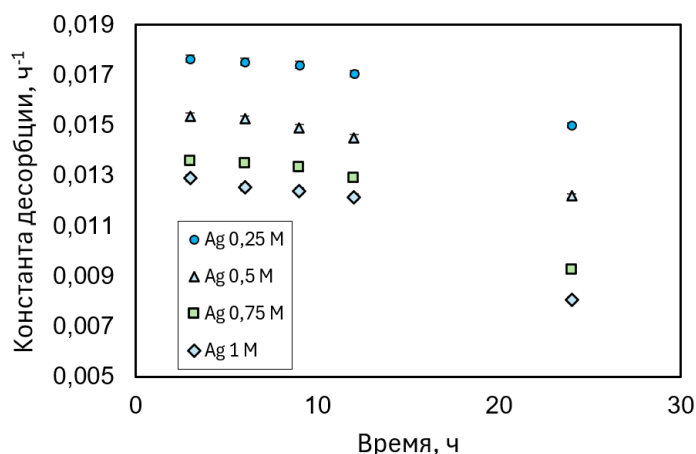


Рисунок 13. Зависимости константы скорости десорбции конъюгата ТРИЦ-БСА из микроконтейнеров от времени инкубации при различном содержании серебра в оболочках.

Эксперименты *in vivo* по высвобождению конъюгата ТРИЦ-БСА под действием лазерного излучения проводили в течение 6 часов после синтеза микроконтейнеров, что позволило сохранить значительное

количество конъюгата ТРИЦ-БСА внутри микроконтейнеров.

Поглощение контейнеров нематодами оценивали через 4 и 24 часа (**Рисунок 14**). В течение первых 4 часов наблюдали незначительное накопление микроконтейнеров в организме нематоды. Микроконтейнеры размером 3.0 ± 0.8 мкм продемонстрировали низкое накопление в кишечнике (1-2 микроконтейнера в организме нематоды). Использование микроконтейнеров размером 0.9 ± 0.1 мкм приводило к выявлению более 10 контейнеров в организме *C. elegans* (**Рисунок 14 а, в**). Через 24 часа наблюдали увеличение количества контейнеров в организме *C. elegans* как для контейнеров размером 0.9 ± 0.1 мкм, так и для контейнеров размером 3.0 ± 0.8 мкм (**Рисунок 14 б, г**).

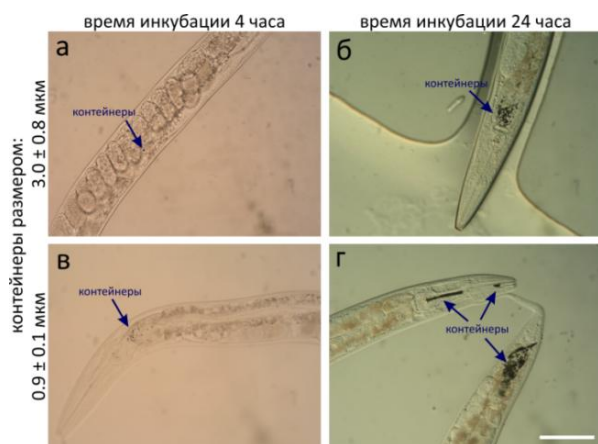


Рисунок 14. Фазово-контрастные микроскопические изображения *C. elegans* с гибридными контейнерами внутри (размеры контейнеров составляют 3.0 ± 0.8 мкм (а, б) и 0.9 ± 0.1 мкм (в, г)) при разном времени инкубации: 4 часа (а, в) и 24 часа (б, г). Масштабная линейка составляет 40 мкм.

Хотя микроконтейнеры размером 0.9 ± 0.1 мкм представляются оптимальными для кормления *C. elegans*, частицы размером 3.0 ± 0.8 мкм

обладают преимуществом в визуализации с помощью микроскопии Номарского и флуоресцентной микроскопии, позволяя проводить подробное изучение лазерно-стимулированного высвобождения. Поглощение микроконтейнеров *C. elegans* подтверждали конфокальной микроскопией через 4 часа (**Рисунок 14**). Накопление частиц внутри кишечника заняло менее 4 часов, что подтверждается трехмерной конфокальной реконструкцией (**Рисунок 15 а-в**).

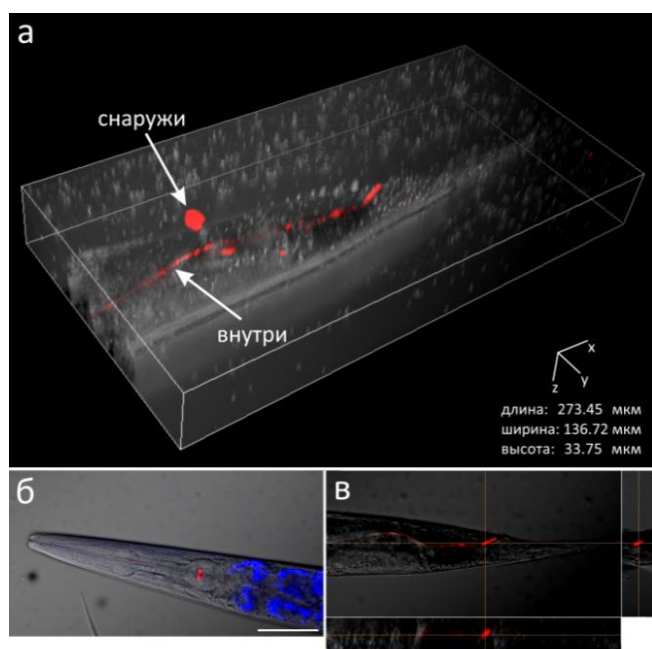


Рисунок 15. Изображения конфокальной флуоресцентной микроскопии *C. elegans* с гибридными контейнерами (размер 3.0 ± 0.8 мкм). 3D-изображение нематода с контейнерами, загруженными молекулами конъюгата ТРИЦ-БСА (красный цвет), изображение показывает контейнеры внутри (в кишечнике червя) и снаружи (а). 2D изображение *C. elegans* кишечника (синий цвет) и контейнеров (красный цвет) - масштабная линейка соответствует 50 мкм (б). Поперечное сечение прямой кишки нематода с гибридными контейнерами (в).

Для изучения высвобождения конъюгата ТРИЦ-БСА в нематоде использовали интенсивности лазерного излучения, описанные в **Главе 3**. Далее, выбирали участок червя, содержащий микроконтейнеры и подвергали лазерному излучению с последующей оценкой профилей флуоресценции конъюгата. Воздействие лазера с интенсивностью излучения 5 мВт на микроконтейнеры нагруженные молекулами конъюгата ТРИЦ-БСА в нематоде не приводило к высвобождению инкапсулированных молекул.

При воздействии лазера с интенсивностью излучения 15 мВт на микроконтейнеры нагруженные молекулами конъюгата ТРИЦ-БСА в нематоде приводило к значительному изменению интенсивности флуоресценции, что обусловлено высвобождением белка из микроконтейнеров (линии 2 и 3 на **Рисунке 16**). Из профилей, представленных на правой панели **Рисунка 16**, очевидно, что общая интенсивность значительно снижается после 10 сек лазерного облучения при мощности 15 мВт. Для обеспечения единообразия флуоресцентной визуализации и сопоставимых результатов собирали профили интенсивности на двух контрольных объектах, не подвергавшихся лазерному облучению – вне червя («контрольные микроконтейнеры») и срез червя без микроконтейнеров, демонстрирующий только автофлуоресценцию («контрольная АФ» на **Рисунке 16**). Таким образом, оценивали изменение интенсивности флуоресценции (за счет высвобождения белка) в поглощенных оболочках при лазерном облучении (линии 2 и 3 на **Рисунке 15**). Это позволяет связывать снижение интенсивности флуоресценции конъюгата исключительно с его интенсивным высвобождением через оболочку микроконтейнера, а не с выцветанием ТРИЦ-БСА. Это также подтверждается тем фактом, что длина волны лазера (785 нм) обладает меньшей энергией и находится далеко от пика возбуждения ТРИЦа (около 600 нм).

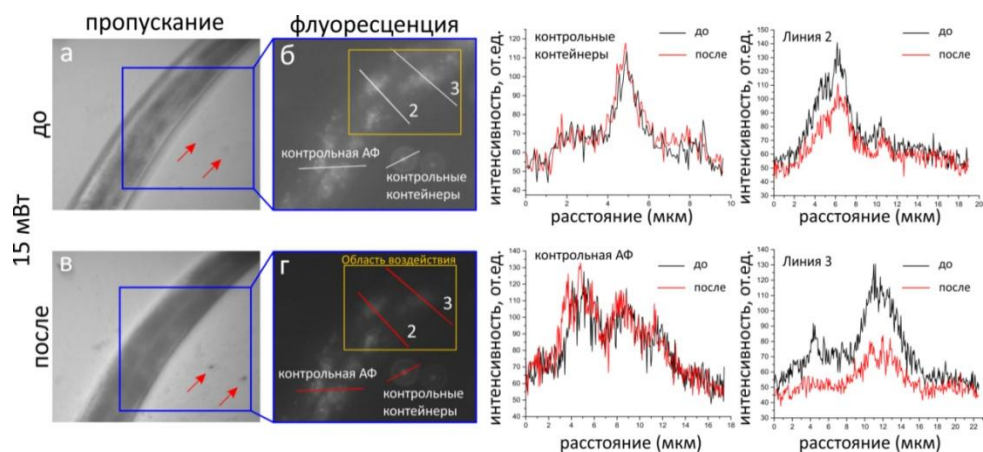


Рисунок 16. Высвобождение конъюгата ТРИЦ-БСА посредством лазера из контейнеров в нематоде *C. elegans*. Слева: светлопольная микроскопия на пропускание и флуоресцентные изображения одной того же участка червя *C. elegans* с захваченными контейнерами непосредственно перед (верхний ряд, а и б) и после (нижний ряд, в и г) лазерного излучения при 15 мВт. Правая панель демонстрирует соответствующие профили интенсивности вдоль линий, показанных на (в, г), контрольная автофлуоресценция – срез нематоды без контейнеров.

Воздействие лазерного излучения (785 нм, 10 сек, 15 мВт) на нематоды *C. elegans*, содержащие гибридные микроконтейнеры, позволяет осуществить вскрытие оболочки и высвобождение иммобилизованного конъюгата ТРИЦ-БСА *in vivo*, без пагубного воздействия на живой организм.

В заключении сформулированы основные результаты и выводы, полученные в ходе выполнения диссертационного исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработан способ получения микроконтейнеров методом темплатного синтеза, обеспечивающий одновременное протекание растворения частиц ватерита и формирования активных центров в полимерной матрице. Исследование термодинамических и кинетических аспектов позволило выявить основные физико-химические закономерности формирования структур «ядро-оболочка», что способствует контролю морфологии и функциональных свойств микроконтейнеров.
2. Установлено влияние состава темплатных ядер ватерита на структуру гибридной альгинатной оболочки. Показано, что концентрация нитрата серебра существенно влияет на поверхностную плотность и размер, а также образование структурных дефектов. При низких концентрациях нитрата серебра (0,1 М) наблюдается недостаточная плотность наночастиц в оболочке микроконтейнеров. В то же время высокие концентрации (1,25 М) приводят к образованию игольчатых структур. Оптимальная концентрация нитрата серебра 0,75 М способствует формированию наночастиц серебра размером 35 ± 9 нм с высокой плотностью дефектов двойников в гранецентрированной кубической решетке {111}. Синтез наночастиц серебра, проводимый *in situ* в альгинатной матрице оболочек микроконтейнеров, с небольшими (т.е. расстояние между наночастицами серебра 1–5 нм) межчастичными плазмонными взаимодействиями в альгинатной матрице оболочек микроконтейнеров позволяет значительно повысить интенсивность сигнала комбинационного рассеяния света, что

позволяет детектировать присутствие в суспензии модельного соединения Родамин Б в диапазоне концентраций от 0,01 до 1000 мкМ.

3. Установлено влияние условий сорбции магнитных наночастиц в различные слои микроконтейнеров на эффективность процесса. Показана зависимость между содержанием магнитных наночастиц и размером микроконтейнеров, в том числе при добавлении МНЧ во внешние слои. В частности, увеличение содержания наночастиц магнетита в оболочке приводит к росту размеров микроконтейнеров: при сорбции наночастиц внутренней поверхностью оболочек размер увеличивается примерно на 77% по сравнению с образцами без магнетита (средний размер увеличился с $3,9 \pm 0,5$ мкм до $6,9 \pm 0,9$ мкм). Количество адсорбированных наночастиц МНЧ прямо пропорционально увеличению размеров контейнеров, что негативно сказывается на седиментационной устойчивости.
4. Определены зависимости констант скорости десорбции конъюгата ТРИЦ-БСА из микроконтейнеров в водном растворе от содержания серебра в оболочке микроконтейнеров. С увеличением содержания серебра в оболочке микроконтейнеров (от 0,25 М до 0,5 М) наблюдается снижение константы скорости десорбции конъюгата ТРИЦ-БСА (с 0,0176 до 0,0129 ч⁻¹ после 3 часов инкубации). Это свидетельствует о том, что более высокая доля серебра в оболочке способствует более устойчивому удержанию конъюгата внутри микроконтейнеров, замедляя процесс его высвобождения. Таким образом, увеличение содержания серебра в оболочке приводит к снижению скорости десорбции, за счет утолщения и изменения свойств оболочки, что препятствует быстрому высвобождению активного вещества.
5. Установлено влияние размера использованных темплатных ядер на результаты ультразвуковой обработки суспензии микроконтейнеров. Показано, что скорость десорбции и степень разрушения контейнеров ультразвуковым воздействием (35 кГц, 0,64 Вт/см²) зависят от размера микроконтейнеров, причем наибольший эффект наблюдается для контейнеров размером 3.0 ± 0.8 мкм, что связывается с неоднородностью их оболочки. Микроконтейнеры меньшего размера (0.9 ± 0.1 мкм) демонстрируют повышенную устойчивость к УЗ-воздействию. Полученные данные указывают на возможность контролируемого высвобождения инкапсулированного вещества с помощью ультразвука.
6. Лазерное излучение (15 мВт, 785 нм) эффективно стимулирует десорбцию конъюгата ТРИЦ-БСА из разрушенных оболочек гибридных микроконтейнеров в нематоде, о чём свидетельствует значительное снижение флуоресценции. Воздействие меньшей мощности (5 мВт) не приводит к десорбции конъюгата. Контрольные эксперименты исключили фотовыцветание флуорофора как причину снижения сигнала. Продemonстрирована возможность контролируемой десорбции инкапсулированного вещества посредством лазерного облучения.
7. Проведена апробация гибридных микроконтейнеров с адсорбированным модельным конъюгатом ТРИЦ-БСА на биологической модели нематоды *C. elegans*. Установлено, что синтезированные наночастицы серебра *in situ* в альгинатной матрице оболочек микроконтейнеров способны вызывать десорбцию высокомолекулярного соединения из альгинатных микроконтейнеров под воздействием ИК лазерного излучения, включая условия *in vivo*, без негативного влияния на биологические объекты (*C. elegans*).

Список наиболее значимых публикаций автора

Статьи в журналах, входящих в перечень ВАК и библиографические базы Web of Science и Scopus:

1. **E. Lengert**, A.M. Yashchenok, V. Atkin, A. Lapanje, D.A. Gorin, G.B. Sukhorukov, B. V. Parakhonskiy. Hollow silver alginate microspheres for drug delivery and surface enhanced Raman scattering detection // RSC Adv. — 2016. — No. 24 (6). — P. 20447–20452.
2. **E. Lengert**, M. Saveleva, A. Abalymov, V. Atkin, P.C. Wuytens, R. Kamyshinsky, A.L. Vasiliev, D.A. Gorin, G.B. Sukhorukov, A.G. Skirtach, B Parakhonskiy. Silver Alginate Hydrogel Micro- and Nanocontainers for Theranostics: Synthesis, Encapsulation, Remote Release, and Detection // ACS Applied Materials and Interfaces. — 2017. — No. 26 (9). — P. 21949–21958
3. **E. Lengert**, A. Kozlova, A.M Pavlov., V. Atkin, R. Verkhovskii, R. Kamyshinsky, P. Demina, A.L. Vasiliev, S.B. Venig, T. V. Bukreeva. Novel type of hollow hydrogel microspheres with magnetite and silver nanoparticles // Materials Science and Engineering: C. — 2019. — (98). — P. 1114–1121.
4. **E. Lengert**, B. Parakhonskiy, D. Khalek, A. Zečić, M. Vangheel, J.M. Monje Moreno, B.P. Braeckman, A.G. Skirtach. Laser-induced remote release *in vivo* in *C. elegans* from novel silver nanoparticles-alginate hydrogel shells // Nanoscale. — 2018. — No. 36 (10). — P. 17249–17256.
5. **E.V. Lengert**, A. A. Savkina, A.V. Ermakov, M. S. Saveleva, D. D. Lagutina, T.V. Stepanova, A.N. Ivanov. Influence of the new formulation based on silver alginate microcapsules loaded with tannic acid on the microcirculation of the experimental periodontitis in rats // Materials Science and Engineering: C. — 2021. — No. 126. — P. 112144
6. **E. Lengert**, M. Saveleva, R. Verkhovskii, A. Abramova, I. Goryacheva Novel formulation of glucocorticoid based on silver alginate microcapsules for intraarticular drug delivery // Materials Letters. — 2021. — No. 288. — P. 129339
7. **Е. В. Ленгерт**, А. В. Ермаков, А. Н. Иванов. Влияние импульсов электрического поля на суспензию микроконтейнеров, состоящих из органического полимера и магнитных наночастиц // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2021. Т. 21, вып. 3. С. 206-212.
8. А.О. Кузнецов, Ю.Н. Власичева, **Е.В. Ленгерт**, А.В. Ермаков. Формирование структур ядро-оболочка с возможностью pH-чувствительного высвобождения инкапсулированных соединений. Коллоидный журнал. 2023. Т 85, № 3, 328-338
9. А.В. Ермаков, Р.А. Верховский, А.Н. Иванов, **Е.В. Ленгерт**. Современные подходы к дизайну лекарственных носителей для pH-чувствительных систем доставки: основные принципы и проблемы // Бутлеровские сообщения. 2024. Т. 77, № 2. С. 1-22

Тезисы докладов:

1. Ekaterina Lengert, Irina Vidyasheva, Bogdan V. Parakhonskiy, Alexey M. Yashchenok, Dmitry A. Gorin, Gleb B. Sukhorukov, Hollow plasmonic silver alginate microspheres as effective SERS-substrate for detection of low concentrated samples, Saratov Fall Meeting-2019 «VII Symposium on Optics & Biophotonics», September 23-27, 2019, Saratov, Russia, <http://sfm.eventry.org/report/1843>
2. «Противовоспалительный эффект геля, содержащего микрокапсулы альгината серебра, заполненные таниновой кислотой, на морфологические изменения тканей пародонтального комплекса у белых крыс с экспериментальным пародонтитом». Технологические инновации в травматологии, ортопедии и нейрохирургии: интеграция науки и практики - Международная научно-практическая конференция. г. Саратов, 21 апреля 2022.
3. Савкина А.А., Ленгерт Е.В., Ермаков А.В., Степанова Т.В., Лойко Д.Д. В книге: Микроциркуляция и гемореология. Материалы XIV международной научной конференции по микроциркуляции и гемореологии. Ярославль, 2023. С. 88.