

УДК 66.021.2.081.3-66.091.1

ПРОБЛЕМЫ ИНКАПСУЛИРОВАНИЯ. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МЕТКИ В СИСТЕМАХ ПЕРОРАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ БЕЛКОВ

Н.Н. Сударева, О.М.Суворова, **В.Д.Паутов**

Институт высокомолекулярных соединений РАН, г. Санкт-Петербург

Обсуждается эффективность применения флуоресцентных меток (ФМ) для изучения пероральных систем доставки (СД) белков. Исследуемые СД формируют из пористых CaCO_3 ядер, покрытых методом полиэлектролитной сборки слоями полимеров с избыточными зарядами разных знаков. Другой вариант формирования двухуровневых СД – включение CaCO_3 ядер с белками в альгинатные гранулы. ФМ позволяют визуализировать наличие и распределение меченых объектов в системах доставки (СД) различной структуры. На примерах инкапсулирования терапевтических белков антагониста рецептора интерлейкина1 и супероксиддисмутазы в СД различной структуры оценено влияние ФМ на функциональные и структурные характеристики СД.

Ключевые слова: Пероральные системы доставки, флуоресцентные метки, белки, полиэлектролиты, лазерная конфокальная сканирующая микроскопия

DOI 10.26456/vtchem2019.1.18

Использование флуоресцентных меток (ФМ) широко применяется в изучении формирования различных систем доставки. ФМ позволяют визуализировать нахождение и распределение меченых объектов в структурах систем доставки [1].

Для определения **структурных** характеристик СД применяют лазерную конфокальную сканирующую микроскопию (ЛКСМ). Принцип работы ЛКСМ основан на детектировании сигналов флуоресценции, возникающих при облучении ФМ, присоединенных к исследуемому объекту. ФМ может быть присоединена как к целевому объекту, так и к элементам системы доставки. Имеется достаточное количество публикаций на тему инкапсулирования с использованием ФМ. Чаще всего ЛКСМ применяют при исследовании инкапсулирования в многослойные полиэлектролитные капсулы, сформированные на ядрах различной природы, а именно: на пористых карбонатных ядрах [2] или на агломератах из целевых объектов [3]. ЛКСМ использована для визуализации преимущественного расположения меченых белков при их включении в CaCO_3 ядра

различными способами – соосаждением и диффузией [4]. Окраска распределена более или менее равномерно внутри окружности при включении белка методом соосаждения. В случае включения белка диффузионным методом ФМ детектируется ближе к поверхности ядер. При помощи ЛКСМ, выявлено влияние ММ полимеров, используемых для формирования ПЭ оболочки, на глубину их проникновения вовнутрь ядра [5]. В работе [1] оболочки спор ликоподия использовали для инкапсулирования ряда флуоресцентных красителей и меченных ФМ белков. Была обнаружена зависимость расположения меченых объектов от их размеров и химической природы. Использование ЛКСМ позволяет исследовать проникновение СД или инкапсулированных объектов в клетки [6,7], их распределение по органам и тканям [8,9].

Не следует забывать, что даже самые современные ЛКСМ – оптические приборы. Законы оптики ограничивают разрешающую способность этих приборов. Например, для микроскопа LSM 710 при апертурном угле $\pi/2$, масляной иммерсии и длине волны лазера 488 нм, согласно уравнению Гельмгольца, разрешающая способность не превышает 0.2 мкм. Если учесть, что размеры систем доставки, использованных в работах [1-5] находятся в диапазоне 3-10 мкм, то становится ясно, что конфокальная микроскопия систем доставки может давать лишь оценочные данные о распределении меченых компонентов в системах доставки. Упомянем еще одну особенность использования высокоэнергетического лазерного излучения, применяемого в ЛКСМ. Длительное (порядка 30 минут) наблюдение меченой пробы приводит к ее «выгоранию» и уменьшению интенсивности, а иногда и к исчезновению флуоресценции.

Для оценки эффективности использования различных СД необходимо уметь адекватно оценивать их **функциональные** характеристики – включение и высвобождение инкапсулируемых целевых объектов (в нашей работе - белков). Для этого нужно уметь определять содержание целевых объектов в растворах. Присоединение ФМ к белкам увеличивает чувствительность детектирования белков по сравнению со спектроскопическим анализом почти на порядок. Однако существует ряд проблем использования ФМ при инкапсулировании белков, которые связаны с изменением физико-химических свойств белков после присоединения ФМ. В данной работе мы подробно рассмотрим возникающие сложности и предложим некоторые пути их преодоления.

Характеристики использованных для инкапсулирования белков, как терапевтических, так и модельных приведены в Табл. 1. Терапевтические белки: ингибитор цитокина - антагонист рецептора интерлейкина 1 (арИЛ1) и антиоксидантный фермент супероксиддисмутаза (СОД) являются рекомбинантными белками. Множественность форм рекомбинантных белков объясняется их

посттрансляционной окислительной модификацией. Например, для СОД характерен широкий интервал значений изоточки.

Т а б л и ц а 1

Характеристики использованных белков

Белок	Сокращенное название	ММ, кДа	pI
Антагонист рецептора интерлейкина 1	арИЛ1	15	7.0
Супероксиддисмутаза*	СОД	32	5,35 - 6,75
Бычий сывороточный альбумин	БСА	65	4.9

*Гомодимер, содержащий по одному иону Cu^{++} и Zn^{++}

Белки арИЛ1 и СОД получены от НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека, БСА от Sigma Aldrich. В работе использовали полиэлектролиты: альгинат средней вязкости (Архангельский водорослевый комбинат), а также хитозан средней вязкости и желатин А (Sigma-Aldrich).

В качестве меток использовали флуоресцирующие группировки, присоединенные к белкам реакцией флуоресцеин изотиоцианата (ФИТЦ), данзилхлорида (ДНС) и антриметил изоцианата (АМИЦ) (все от Sigma-Aldrich) с соответствующими функциональными группами белка. Спектральные характеристики флуорофоров, ковалентно присоединенных к белкам, приведены в Таблице 2

Т а б л и ц а 1

Флуорофор	Поглощение, нм	Эмиссия, нм
АМИЦ	340 – 385	485-500
ФИТЦ	494	520
ДНС	340	510

Снимки СД разной структуры проводили при помощи лазерных конфокальных микроскопов Zeiss LSM 710 (Zeiss, Германия) с длиной волны облучения 488 нм и Leica TCS SL (Leica, Германия) с длиной волны облучения 405 нм.

Системы доставки изготавливали следующим образом:

1. Пористые ватериты CaCO_3 формировали согласно [2] при соосаждении равных объемов 0.33 М растворов солей Na_2CO_3 и $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, при постоянном перемешивании в течение 30 секунд. После «созревания» в течение 15 минут ядра промывали. Для

инкапсулирования белков, их растворяли в $0.33 \text{ M CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и проводили процедуру, как указано выше. Промывку проводили до нулевой экстинкции фильтрата. Загрузку белка определяли по разнице введенного в эксперимент белка и суммы вышедшего белка при фильтрации и промывке.

2. Полиэлектролитные капсулы формировали также по методике, приведенной в [2], а именно: послойным нанесением полианиона (альгината) и поликатиона (хитозана или желатина А) на CaCO_3 ядра с белком. Изоточка желатина А равна 8.0, следовательно, в нейтральной среде он несет избыточный положительный заряд. Использовали 0.2 М растворы полимеров в 0.5М растворе NaCl. Ядра растворяли при помощи 0.2М хелатного агента этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА).

3. Двухуровневые системы доставки формировали по методике из [5], в которой ядра с белком суспендировали в растворе альгината Na, а затем прикапывали в осадительную ванну, содержащую 1% раствор CaCl_2 в 0,5% растворе хитозана (ММ=220 кДа) в 1% уксусной кислоте для проведения ионной сшивки. В результате формировали альгинатные гранулы, содержащие белок, инкапсулированный в CaCO_3 ядра.

Инкубационные среды, в которых анализировали выход белков из различных СД, были: 0.1М HCl pH=1.0 и 0,2М Na-фосфатный буфер pH=8,0. Первая – среда, имитирующая среду желудка (СИЖ), вторая – среду кишечника (СИК). Инкубацию СД осуществляли при непрерывном перемешивании и $T=37^\circ\text{C}$. Отбор аликвот из инкубационных смесей осуществляли периодически в течение 6 – 40 часов.

ЭДТА, а также все соли, использованные в эксперименте, получены от Sigma-Aldrich. Растворы готовили на деионизованной воде с проводимостью $0.056 \mu\text{S}/\text{cm}$ (Веткон).

Количественное определение белков в растворах проводили методами УФ-спектрофотометрии (спектрофотометр Specord UV VIS, Zeiss, Германия) и флуоресценции (люминесцентный спектрофотометр LS-100, РТИ, Германия) с использованием калибровок в соответствующих средах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Флуоресцентные метки на белках, изменение их физико-химических свойств

В работе исследовали влияние наличия флуоресцентной метки на взаимодействие белков с компонентами систем доставки. Белки инкапсулировали в CaCO_3 ядра. СД были сформированы на основе

CaCO₃ ядер, покрытых несколькими слоями пар полиэлектролитов разных знаков, или содержащихся в альгинатных гранулах. В качестве меток использовали такие флуорофоры, как флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ), данзилхлорид (ДНС) и антриметил изоцианат (АМИЦ), которые присоединяются к молекуле белка по аминокетильным группам (боковым, содержащимся в основных аминокислотах, и концевым). Таким образом, количество основных аминокислот в молекуле белка определяет чувствительность его детектирования методом флуоресценции. К сожалению, аминокислотный состав исследованных терапевтических белков СОД и арИЛ1 неизвестен. Однако, согласно данным энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии, весовое содержание азота (вес.%) в арИЛ1 в полтора раза больше, чем в СОД. Скорее всего в составе арИЛ1 присутствует большее, чем в СОД, количество основных аминокислот. В дальнейшем эти различия проявятся в поведении обоих меченых белков. Присоединение меток к молекулам альгината происходило по гидроксильным группам полимера.

Рассмотрим основные проблемы адекватности поведения меченых и интактных белков в процессах инкапсулирования и высвобождения из систем доставки.

1. Изменяется или пропадает растворимость меченых белков в некоторых средах. К сожалению, эта особенность осложняет использование белков с ФМ в ходе их инкапсулирования в некоторые системы доставки. Как указано в экспериментальной части методика инкапсулирования белков в CaCO₃ ядра включает этап растворения целевого белка в одном из компонентов раствора для формирования CaCO₃ ядра – CaCl₂ или Na₂CO₃. Например, присоединение ДНС к белку арИЛ1 приводит к потере растворимости меченого белка в воде и в растворах CaCl₂ и NaCl.

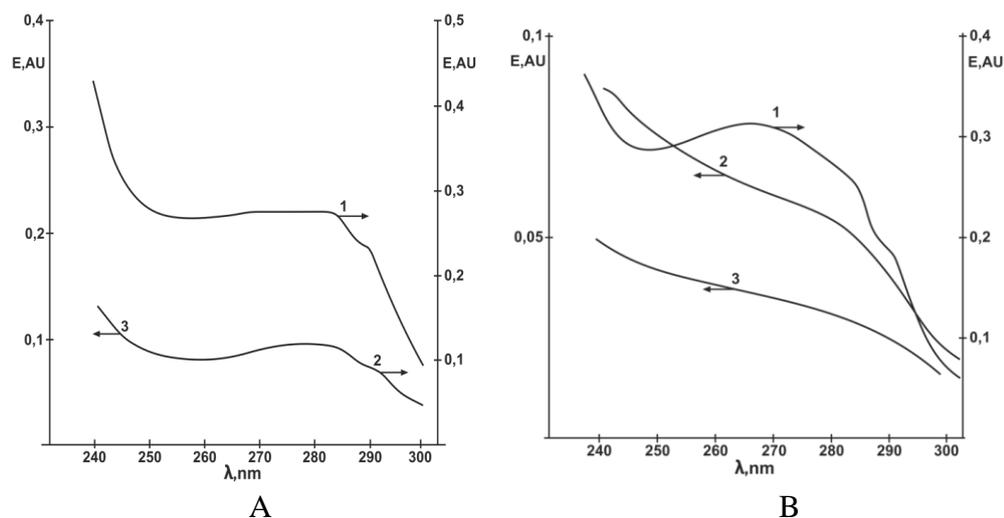
2. Флуоресценция меток зависит от состава растворителя. В некоторых случаях флуоресценция вовсе исчезает [11]. Эта особенность флуоресцирующих соединений, активно используемая в химии, диагностике и пр., в количественной оценке загрузки меченых белков в CaCO₃ ядра и их высвобождения приводит к определенным трудностям. Сравнение спектров флуоресценции растворов арИЛ1/Д и СОД/Д при молярных соотношениях белок/ДНС=1/0.65 и 1/1.8, соответственно, и при одинаковых молярных концентрациях в 0.1 М HCl показывает, что интенсивность флуоресценции первого белка намного (в 12 раз) выше, чем интенсивность второго, несмотря на то, что количество флуорофора в нем в 2.8 раза меньше. Этот факт можно объяснить явлением тушения флуоресценции, определяемым составом окружающей флуорофор среды. Как известно, в составе СОД содержатся ионы Cu⁺⁺ и Zn⁺⁺. Ионы меди являются очень сильным тушителем флуоресценции, что и

приводит к заниженной интенсивности флуоресценции СОД/Д по сравнению с арИЛ1/Д.

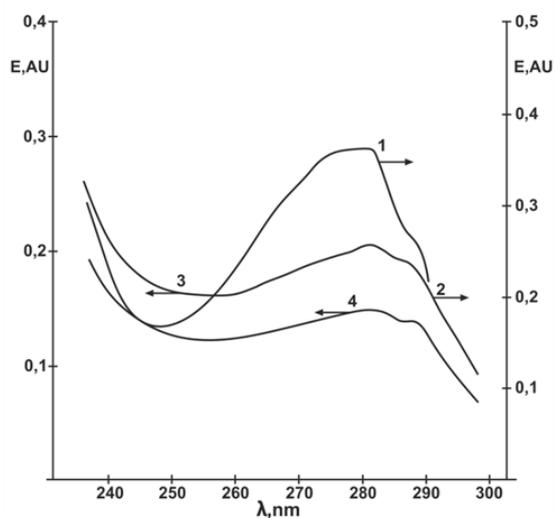
Высвобождение белка из пероральных систем доставки в модельные растворы, сопровождается значительным изменением ионного состава окружающей белок среды. Обнаружено увеличение интенсивности флуоресценции арИЛ1/Д=1/0.65 при увеличении рН среды. При растворении карбонатных ядер в 0.1N HCl происходит рост рН раствора до 3 единиц. Интенсивность флуоресценции арИЛ1/Д в такой ситуации увеличивается в 2.5 раза. Этот факт может серьезно осложнить детектирование «выхода» белка из СД с карбонатными ядрами в желудочной (кислой) среде. При нахождении CaCO₃ ядер в фосфатном буфере, который часто используется в качестве раствора, моделирующего среду кишечника, в ходе реакции ионного обмена CaCO₃ и Na₃PO₄ происходит уменьшение рН раствора [12].

3. УФ-спектры меченых белков при изменении состава окружающей среды также изменяются по сравнению с интактными белками. На рисунках 1А и 1В приведены спектры интактного и меченого ДНС белка СОД (СОД/Д = 1/1.9) в ФБ, а также спектры этих белков, высвободившихся в ФБ из CaCO₃ ядер (релиз). Аналогичные изменения спектров наблюдали для интактного белка арИЛ1/Д (1/0.65).

Анализ спектроскопических данных указывает на различия во влиянии ионного состава окружающей среды на оптические свойства разных белков. СОД не изменяет свои оптические, а, следовательно, и структурные свойства при выходе из карбонатных ядер в окружающую модельную среду кишечника (Рис.1А). Иная ситуация наблюдается с СОД, меченым ДНС (1/1.9) (Рис.1В), и арИЛ1 без метки (Рис.2). У последнего белка наблюдается изменение профиля релизов по сравнению с исходным раствором, но положение максимума (283 нм) сохраняется. Видимо, арИЛ1 имеет на поверхности глобулы активные аминокислотные остатки, определяющие зависимость спектров от ионного состава среды, а также способствующие адсорбции.



Р и с . 1. А - УФ спектры: 1 – исходный раствор СОД в ФБ рН=8.0; релиз из CaCO_3 ядер, содержащих СОД, находящихся в ФБ рН=8.0 в течение 2 (2) и 4.5 (3) часов при $T=37^\circ\text{C}$; Профили спектров 2 и 3 совпадают. В - УФ спектры: 1 – исходный раствор СОД/Д (1/1.9) в ФБ рН=8.0; релиз из CaCO_3 ядер, содержащих СОД/Д, находящихся в ФБ рН=8.0 при $T=37^\circ\text{C}$ в течение 2 (2) и 5 (3) часов



Р и с . 2. УФ спектры: 1 – исходный раствор арИЛ1 в ФБ рН=8.0; 2 - релиз из CaCO_3 ядер, содержащих арИЛ1, находящихся в ФБ рН=8.0 при $T=37^\circ\text{C}$ в течение 2 (2), 4.5 (3) и 25 (4) часов

Т.е. определение функциональных характеристик меченых белков при помощи УФ- и флуоресцентной спектроскопии требует

построения калибровочных зависимостей во всех используемых средах. Выполнение этих требований позволяет получить величины загрузки близкие для обоих способов детектирования (Таблица 3).

Таблица 3

Сравнение различных способов определения загрузки белков в CaCO₃ ядра

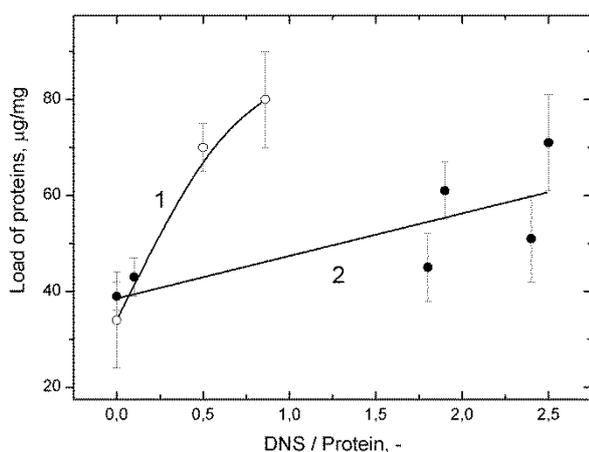
Белок	Концентрация белка С, мг/мл	Белок/ флуорофор	Загрузка, L, $\mu\text{г}/\text{мг}$. УФ	Загрузка, L, $\mu\text{г}/\text{мг}$. ФЛУ
арИЛ1	0.8	1/05 ДНС	22.0	26.6
	2.5		96.0	96.0
СОД	2.0	1/0.1 ДНС	37.6	40.6
	1.7	1/2.4 ДНС	41.9	42.8
БСА	4.5	1/0.67 АМИЦ	73.0	71.0

2. Включение меченых белков в CaCO₃ ядра

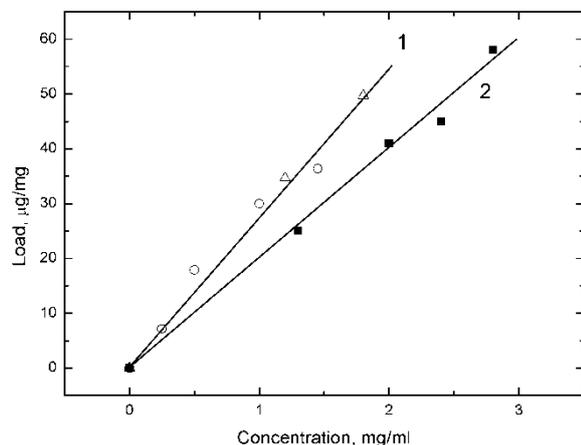
При включении меченых белков в карбонатные ядра методом соосаждения наблюдали зависимость загрузки белка (количество белка на единицу веса носителя – CaCO₃ ядер) от количества и структуры меток, присоединенных к молекуле белка. На рис. 3 приведены зависимости загрузки белков СОД и арИЛ1, интактных и меченых разным количеством молекул ДНС на 1 молекулу соответствующего белка. Загрузку проводили методом соосаждения при исходной концентрации белков равной 2 мг/мл.

Величины загрузки белков, меченых ДНС, выше, чем величины загрузки интактных, и увеличивается с увеличением количества присоединенной метки. Причем для молекул арИЛ1 влияние пришитых меток гораздо сильнее, чем для СОД (Рис.3, кривые 1 и 2).

Для антраценовой метки наблюдали обратную зависимость - загрузка БСА, меченого антриметил изоцианатом (1/0.73), незначительно понижается. Концентрационные зависимости загрузки интактного и меченого БСА приведены на рисунке 4.



Р и с. 3. Зависимость загрузки белков арИЛ1 (1) и СОД (2) от количества присоединенных ДНС меток

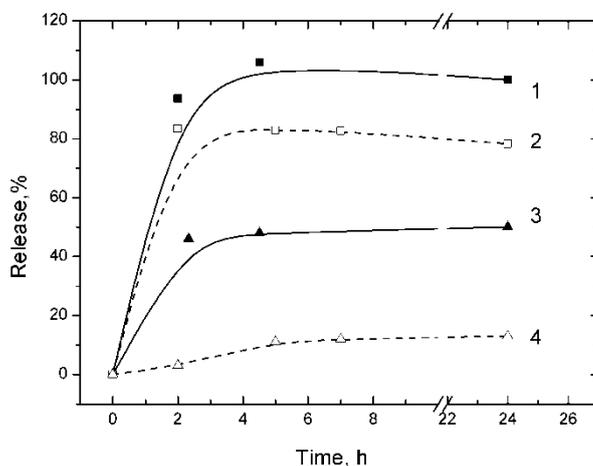


Р и с. 4. Концентрационная зависимость загрузки в CaCO_3 ядра белка БСА: интактного (1); меченого антраценом (БСА/АМИЦ= 1/0.73) (2).

Для объяснения следует сравнить химическую структуру меток. ДНС – полярная молекула, АМИЦ – соединение, имеющее большой гидрофобный участок. Загрузка белков при соосаждении зависит от разницы избыточных зарядов на молекуле белка и CaCO_3 ядрах [13]. Можно предположить, что метка АМИЦ экранирует заряды на поверхности белка, уменьшая движущую силу процесса соосаждения.

3. Высвобождение меченых белков из CaCO_3 ядер

В ряде случаев наблюдали уменьшение высвобождения из CaCO_3 ядер меченых белков по сравнению с интактными в раствор, имитирующий кишечную среду 0.2 М ФБ (pH=8.0). На рисунке 5 приведены временные профили высвобождения меченых и интактных белков СОД и аРИЛ1 в среды, имитирующие кишечную среду.



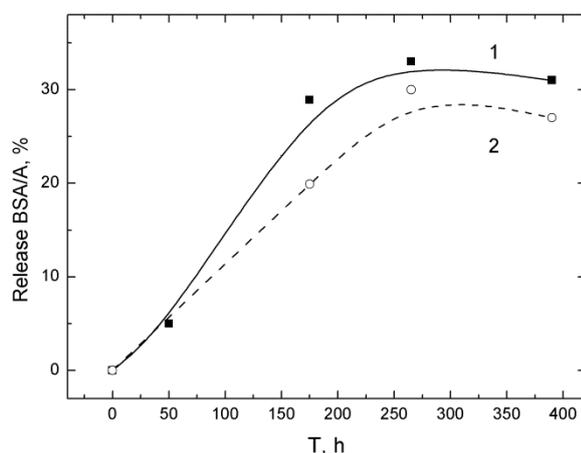
Р и с. 5. Временные профили высвобождения белков в СИК (0.2М ФБ pH=8.0) из CaCO_3 ядер. СОД (1); СОД/Д (2); аРИЛ1 (3); аРИЛ1/Д (4).

На рисунке видно не только уменьшение высвобождения меченых белков по сравнению с интактными, но и меньшее высвобождение аРИЛ1 по сравнению с СОД. Такое поведение белков возможно вследствие увеличения сорбционной активности меченых белков по отношению к карбонатным ядрам за счет пришитой молекулы данзилхлорида. Здесь можно вспомнить рассуждения об активных центрах на поверхности глобулы белка аРИЛ1, приведенные в разделе 1. В результате комплексного влияния обоих факторов аРИЛ1/Д практически не высвобождается в ФБ из CaCO_3 ядер в течение 24 часов. Облучение таких ядер УФ лампой при $\lambda = 365$ нм демонстрируют наличие флуоресценции, что свидетельствует о прочной связи меченого белка аРИЛ1/Д с ядрами.

4. Высвобождение меченых белков из полиэлектролитных капсул

На базе CaCO_3 ядер с инкапсулированным в них БСА, меченого антраценом (БСА/А = 1/0.73), были изготовлены полиэлектролитные (ПЭ) капсулы, состоящие из 5 и 7 пар слоев альгинат-желатин или альгинат-хитозан. После растворения карбонатного ядра меченый белок оставался в ПЭ капсулах. Профили высвобождения меченого белка из

капсул, сформированных из 5 пар слоев ПЭ, приведены на рисунке 6. Значительной зависимости от вида поликатиона (хитозан или желатин) высвобождения белка из капсул разного состава не наблюдается. Зато зависимость от числа слоев очевидна, более толстые оболочки сдерживают выход белка в щелочное окружение. Выход белка за 10 суток из капсул, состоящих из 5 пар ПЭ слоев, не превышает 35 %. Капсулы из 7 пар ПЭ слоев позволяют высвободиться только 15% БСА/А. Следует обратить внимание на существенную пролонгацию выделения белка.



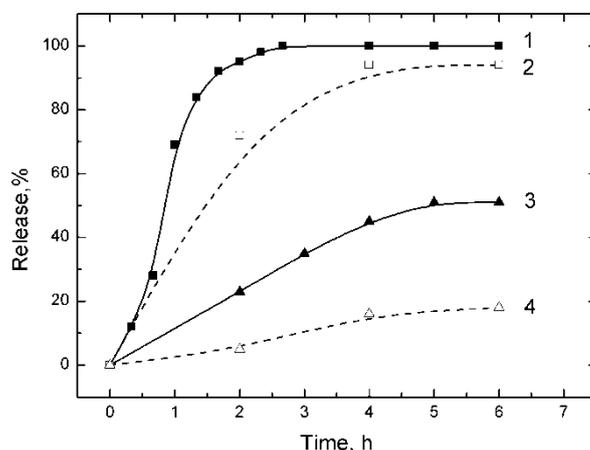
Р и с. 6. Профили высвобождения в СИК белка БСА/АМИЦ (1/0.73) из капсул, состоящих из 5 пар ПЭ слоев. Состав капсул: альгинат-хитозан (1); альгинат-желатин А (2)

Капсулы обоих составов в конце эксперимента флуоресцируют при облучении УФ лампой $\lambda = 365$ нм. Т.е. меченый белок взаимодействует не только с CaCO_3 ядрами, но и с полимерной капсулой. Авторы работы [14] также предположили наличие ассоциации белка глюкоксидазы, меченного цианиновым флуоресцирующим красителем Cy3 , инкапсулированного в полипептидную микрокапсулу, с полимером оболочки.

5. Высвобождение меченых белков из альгинатных гранул и из двухуровневых систем доставки - альгинатных гранул с CaCO_3 ядрами

Обнаруженные взаимодействия меченых белков с материалом носителей (CaCO_3 ядрами и альгинатом) подтверждены и результатами, приведенными на рисунке 7, где сравнивают профили высвобождения интактного белка (СОД) и меченого ДНС - СОД/Д (1/1.9) из СД разной структуры. Из альгинатных гранул, чьи размеры пор находятся в

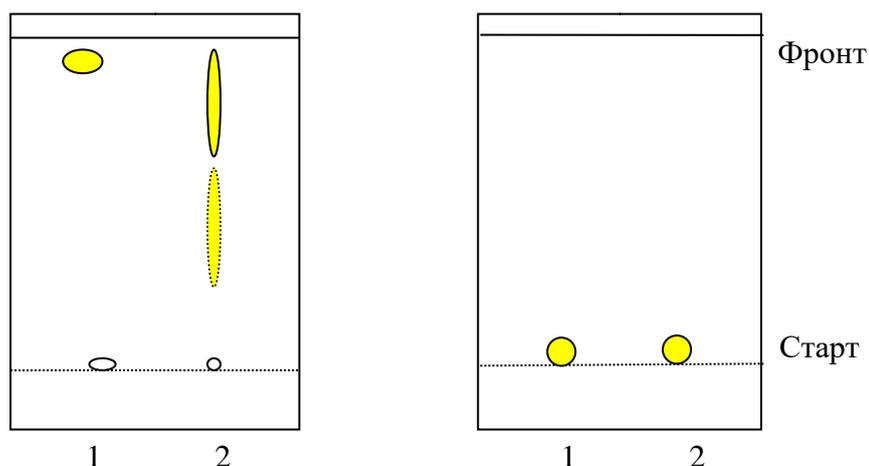
пределах 5-200 нм [15], белок без метки высвобождается в СИК почти на 100% уже в течение двух часов. СОД/Д тормозится даже в широкопористой структуре за счет сорбционного взаимодействия ФМ с альгинатом. В двухуровневых СД торможение из-за взаимодействия происходит на обоих уровнях. В результате высвобождение меченого белка не превышает 10%



Р и с. 7. Временные профили высвобождения в СИК белков СОД (1,3) и СОД/Д (2,4) из альгинатных гранул (1,2) и двухуровневых СД - альгинатных гранул с СаСО₃ ядрами (3,4)

6. Использование тонкослойной хроматографии для детектирования взаимодействий между участниками процесса инкапсулирования

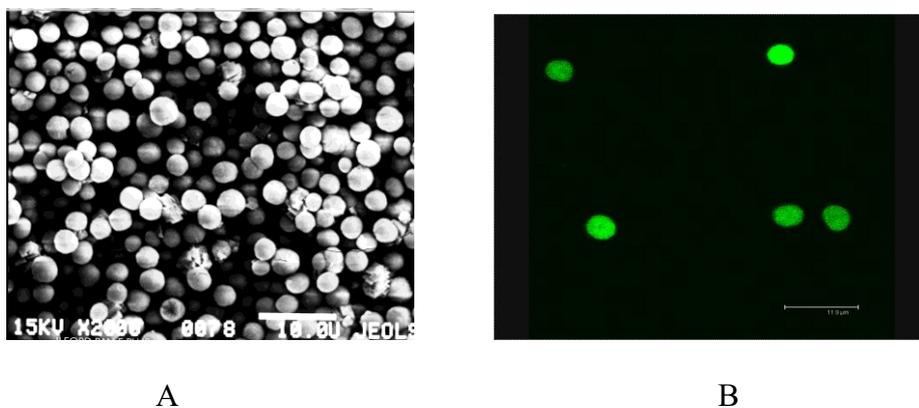
Как видно из результатов, приведенных в разделах 3 - 5, основная проблема, требующая решения для успешного применения инкапсулирования с помощью полиэлектролитной обмотки, при включении в альгинатную гранулу или в двухуровневые системы на базе СаСО₃ ядер – наличие взаимодействий между инкапсулированным белком и компонентами СД. Контроль взаимодействия меченых участников формирования СД (белков и полимеров – альгината и желатина) с СаСО₃ ядрами можно осуществлять при помощи тонкослойной хроматографии (ТСХ). Для этого были изготовлены ТСХ-пластины из суспензии смеси СаСО₃ ядер и гипса (в соотношении 10:1), характеристики таких пластин близки к характеристикам стандартных пластин из силикагеля [16]. На рисунке 8 продемонстрировано наличие сильного взаимодействия ФИТЦ и СаСО₃ ядер. Альгинат, меченый ФИТЦ (500/1), проявляет адсорбцию на СаСО₃ ядрах (Рис.8В), причем более сильную, чем на силикагеле (Рис.8А), даже в условиях высокой ионной силы.



Р и с. 8. Хроматограммы ФИТЦ (1) и альгинат/ФИТЦ (2) на ТСХ-пластинах из силикагеля КСКГ (А) и CaCO_3 ядер (В). Элюент-0.5 М р-р NaCl в воде. Обнаружение хроматографических зон под УФ-365 лампой

6. Конфокальная микроскопия

На рисунке 9 приведены снимки карбонатных ядер с меченым белком БСА, полученные при помощи сканирующего электронного микроскопа (А) и лазерного конфокального сканирующего микроскопа (В).

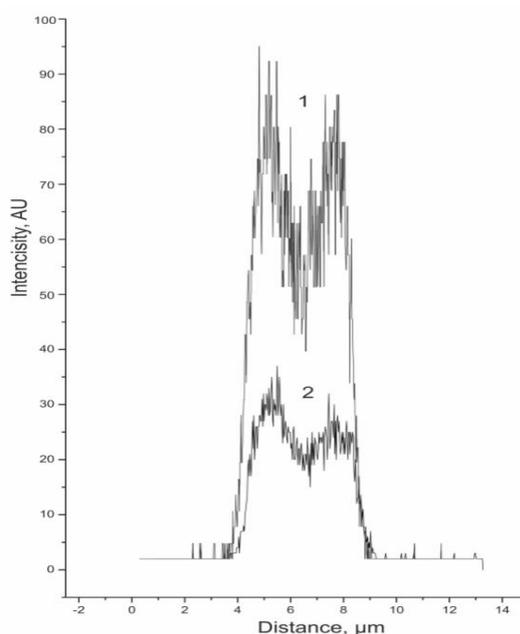


Р и с. 9. (А) СЭМ-фото CaCO_3 ядер, содержащих БСА/АМИЦ и (В) ЛКСМ-фото CaCO_3 ядер, содержащих БСА/ДНС (маркер - 12 μm)

При сопоставлении снимков видно, что размеры ядер, приготовленных в одинаковых условиях (за исключением ФМ на белке), сопоставимы. На изображении, полученном при помощи LSM

710, заметна неоднородность распределения белка. Использование метода энергдисперсионной рентгеновской спектроскопии для анализа атомного состава поверхности и сколов ядер с инкапсулированными мечеными белками показало, что на поверхности содержится больше атомов белка N, следовательно, и белка, чем в центре ядра [17].

Возможности лазерного конфокального сканирующего микроскопа LSM 710, в частности, программа Zen 900, позволяет построить графики интенсивности флуоресценции вдоль любого оптического среза. На рисунке 10 приведены графики интенсивности по диаметральному срезу CaCO_3 ядра (диаметр 5 мкм) покрытого 9 слоям пар полиэлектролитов желатина и альгината, меченого ФИТЦ (9000/1). Данные указывают на большое значение последовательности нанесения слоев полиэлектролитов. Максимальная интенсивность ядер, наружный слой покрытия которых - меченый ФИТЦ альгинат в 1.5 раз больше, чем ядер с наружным слоем желатина. Это свидетельствует о тушении флуоресценции при плотном контакте полимеров.



Р и с. 10. Графики интенсивности оптических срезов CaCO_3 ядер (диаметр 5 мкм), покрытых 9 слоям пар полиэлектролитов желатина и альгината, меченого ФИТЦ (9000/1). Последовательность нанесения: Алг/Ф - Жел - (Алг/Ф-Жел)₃-Алг/Ф (1) и Жел - Алг/Ф -(Жел - Алг/Ф)₃ - Жел (2).

Приведенные замечания не имеют универсального характера, поскольку они были сформулированы в ходе изучения систем доставки белков, формируемых согласно конкретной методике [2]. Однако, опираясь на данные о системах доставки, полученные при помощи

ЛКСМ и флуоресцентной спектроскопии, следует помнить, что эти методы исследуют не интактные объекты, а объекты, имеющие измененные физико-химические характеристики.

Авторы признательны Ананьевой Т.Д. за помощь в присоединении флуоресцентных меток к белкам и полимерам.

Список литературы

1. Barrier S., Diego-Taboada A., Thomasson M.J. Viability of plant spore exine capsules for microencapsulation // *J. Mater. Chem.* 2011.V.21.Pp. 975-981.
2. Volodkin DV, Petrov AI, Prevet M, Sukhorukov GB. Matrix polyelectrolyte microcapsules: new system for macromolecule encapsulation // *Langmuir.* 2004.V.20. Pp. 3398–3406.
3. Balabushevich N.G., Larionova N.I. Fabrication and characterization of polyelectrolyte microparticles with protein // [Biochemistry \(Moscow\)](#). 2004. V. 69. Pp. 757-762.
4. Petrov A.I., Volodkin D.V., Sukhorukov G.B. Protein-Calcium Carbonate Coprecipitation: A Tool for Protein Encapsulation. // *Biotechnology Progress.* 2005. 21.V.3. Pp. 918-925.
5. Volodkin D. V.,Larionova N. I., Sukhorukov G. B. Protein encapsulation via porous CaCO₃ microparticles templating // *Biomacromolecules.* 2004.V.5. Pp. 1962-1972.
6. Gao H., Goriacheva O., Tarakina N., Sukhorukov G. Intracellularly Biodegradable Polyelectrolyte/Silica Composite Microcapsules as Carrier for Small Molecules // *ACS. Appl. Mater. Interfaces.* 2016.V.8. Pp.9651-9661.
7. Jiang A., Li A., Liu A., Zhang A. Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified pullulan nanoparticles // *International Journal of Nanomedicine.* 2013. V. 8. Pp.1825–1834.
8. Florence A. The oral absorpotion of Micro- and nanoparticulates: neither exceptional nor unusual // *Pharm. Research.* 1997.V. 14. Pp. 259-266.
9. Zhang A., Qin A., Hua A., Guo A., ChuA.,Lin A., Zhang A., LiA., Zhang A., Chen A., Liu A. Genetically Engineered Liposome-like Nanovesicles as Active Targeted Transport Platform // *Advanced materials.* 2018. V.30. Pp. 1705350 -60.
10. Sudareva N., Suvorova O., Saprykina N., Vilesov A., Bel'tyukov P., Petunov S. Alginate- containing systems for oral delivery of superoxide dismutase. Comparison of various configurations and their properties // *J. Microencapsul.* 2016. V. 33. Pp. 4874-4896.
11. Greenspan A., Mayer A., Fowler S.D. Nile Red, a Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets // [Journal of Cell Biolog.](#) 1985.V. 100. Pp. 965–973.
12. Sudareva N., Saprykina N., Popova H., VilesovA.. Porous calcium carbonate cores as templates for preparation of peroral proteins delivery systems. The influence of composition of simulated gastrointestinal fluids on the structure and morphology of carbonate cores// In: Cohen A, ed. Calcium Carbonate:

- Occurrence, Characterization and Applications. New York: Nova Science Publishers. Inc. 2016. Pp. 73-96.
13. Sudareva N., Popova H., Saprykina N., Bronnikov S. Structural optimization of calcium carbonate cores as templates for protein encapsulation.// J. Microencapsul. 2014. V. 31. Pp. 333–343.
 14. Zhi A., Haynie A. High-capacity functional protein encapsulation in nanoengineered polypeptide microcapsules // Chem.Commun. 2006. Pp. 147-149.
 15. Santa Maria M., Scher H., Jeoh T. Microencapsulation of bioactives in cross-linked alginate matrices by spray drying // J. Microencapsul. 2012. V.29. Pp. 286-295.
 16. Попова Е.В., Литвинова Л.С., Сударева Н.Н., Иванькова Е.М. Проблемы инкапсулирования. Новые ТСХ пластины на основе пористых карбонатных ядер //Тезисы докладов 8-ой СПб конференции молодых ученых 2012.С.118.
 17. Sudareva N., Popova E., Saprykina N. Application of energy-dispersive spectroscopy to studies of drug delivery systems // 8th International Symposium “Molecular Order and Mobility in Polymer Systems. 2014. P.86.

THE ENCAPSULATION PROBLEMS. FLUORESCENT LABELS IN ORAL DELIVERY SYSTEMS OF PROTEINS

N.N.Sudareva, O.M.Suvorova, L.S.Litvinova, V.D.Pautov

Institute of Macromolecular Compounds of the RAS, St. Petersburg

The efficacy of fluorescent labels (FL) for the study of oral protein delivery systems (DS) is discussed. The investigated DS are formed from porous CaCO₃ cores covered by the method of polyelectrolyte layer-by-layer assembly. Another option for the formation of two-level DS is the inclusion of CaCO₃ cores with proteins into alginate granules. FL allow visualizing the presence and distribution of labeled objects in delivery systems of different structures. On the examples of encapsulation of therapeutic proteins receptor antagonist of interleukin 1 and superoxide dismutase in DS of different structure the influence of FL on functional and structural characteristics of DS is estimated.

Keywords: *Oral delivery systems, Fluorescent labels, Proteins, Polyelectrolytes, Laser confocal scanning microscopy*

об авторах:

СУДАРЕВА Наталья Николаевна – кандидат физ.-мат. наук, научный сотрудник, Институт высокомолекулярных соединений РАН, г. Санкт-Петербург, e-mail: nnsas@mail.ru

СУВорова Ольга Михайловна – ведущий инженер, Институт высокомолекулярных соединений РАН, г. Санкт-Петербург, e-mail: ihs-9@yandex.ru.

Литвинова Лариса Степановна – кандидат химических наук, научный сотрудник, Институт высокомолекулярных соединений РАН, г. Санкт-Петербург, e-mail: litvinls@hq.macro.ru

Паутов Владимир Дмитриевич – доктор физ.-мат. наук, главный научный сотрудник, Институт высокомолекулярных соединений РАН, г. Санкт-Петербург, e-mail: ya.pauto.@yandex.ru

Поступила в редакцию 1 декабря 2018 года