Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

На правах рукописи

ЕРМАКОВ Алексей Вадимович

НАНОКОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ И НЕОРГАНИЧЕСКИХ НАНОСТРУКТУР: ПОЛУЧЕНИЕ И УПРАВЛЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

Специальность 01.04.15 – Физика и технология наноструктур, атомная и молекулярная физика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических-наук

Научный руководитель д.ф.-м.н. Вениг С.Б.

Саратов – 2021

оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Полиионная сборка композитных пленок и микроконтейнеры на их основ	e14
1.2 Массивы микроконтейнеров на подложках	17
1.2.1 Полиионная сборка полиэлектролитных пленок на шаблонах	18
1.2.2 Загрузка массивов микроконтейнеров на подложке	19
1.2.3 Перенос массива микроконтейнеров	20
1.2.4 Загрузка полых микроконтейнеров на подложке через оболочку	21
1.3 Управляемый выпуск веществ	22
1.3.1 Электрохимические и электрические влияющие параметры	22
1.3.2 Температура	22
1.3.3 Ультразвук	24
1.3.4 Магнитные поля	24
1.3.5 Механическая деформация	25
1.3.6 Лазерное излучение	26
1.3.7 Выпуск вещества из массива микроконтейнеров на подложке	28
1.4 Нанокомпозиты на основе оксида графена	29
1.5 Биоминерализация	34
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	37
2.1 Материалы	37
2.2 Производство шаблонов с массивом микролунок	37
2.3 Синтез композитных мультислойных пленок на поверхности ПДМС	
шаблонов	38

2.4 Биоподобная минерализация	
2.5 Сканирующая электронная микроскопия	
2.6 Термогравиметрический анализ	
2.7 Наноиндентирование	
2.8 Синтез оксида графена	
2.9 Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия	41
2.10 Вскрытие микроконтейнеров	41
2.11 Получение микроконтейнеров в виде суспензии	
2.12 Синтез микрокапсул	
2.13 Загрузка микрокапсул фотосенсибилизатором	
2.14 Выпуск фотосенсибилизатора из микрокапсул	
2.15 Поглощение микрокапсул клетками	
2.16 Противораковая фотодинамическая активность микрокапсул, загр	уженных
фотосенсибилизатором	
2.17 Антибактериальная фотодинамическая активность микрокапсул,	
загруженных фотосенсибилизатором	
2.18 Характеризация	
ГЛАВА З СИНТЕЗ И СВОЙСТВА КОМПОЗИТОВ, СОДЕРЖАЩИХ К.	АРБОНАТ
КАЛЬЦИЯ	51
3.1 Биоподобная минерализация полиэлектролитных микроконтейнеро	ов 51
3.1.1 Морфология пленок на шаблоне	53
3.1.2 Морфология композитных микроконтейнеров	54
3.1.3 Анализ состава микроконтейнеров	56
3.1.4 Моделирование механических деформаций микроконтейнеров по	од
действием внешней нагрузки	

3.2 Выводы	65
ГЛАВА 4 КОМПОЗИТНЫЕ ПЛЕНКИ И МИКРОКОНТЕЙНЕРЫ,	
СОДЕРЖАЩИЕ УГЛЕРОДНЫЕ НАПОЛНИТЕЛИ	67
4.1 Микроконтейнеры на основе полиэлектролитов и оксида графена	67
4.1.1 Морфология и структура ПЭМ и ПЭОГМ пленок на поверхности ПМ	MA
шаблонов	67
4.1.2 Моделирование механических деформаций ПЭМ и ПЭОГМ	
микроконтейнеров	75
4.1.3 Выводы	79
4.2 Синтез и свойства композитов на основе полиэлектролитов и углероднь	IX
наноструктур	80
ГЛАВА 5 УПРАВЛЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ	
МИКРОКОНТЕЙНЕРОВ ПРИ ПОМОЩИ ВНЕШНИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ	89
5.1 Действие ИК излучения на микроконтейнеры на основе полиэлектролит	ОВ И
оксида графена	89
5.2 Влияние термической обработки на проницаемость полиэлектролитных	
оболочек	92
5.2.1 Захват и катализированный выпуск фталоцианина цинка	95
5.2.2 Влияние PS-содержащих микрокапсул на раковые и нераковые клетки	t 101
5.2.3 Выводы	108
5.3 Влияние электрического поля на полиэлектролитные микроконтейнеры	,
содержащие наночастицы магнетита	110
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	118

введение

Актуальность темы исследования. Одним из интенсивно развивающихся направлений современных нанотехнологий является разработка новых нанокомпозитных материалов на основе органической матрицы с неорганическим наполнителем. Использование различных наполнителей И режимов ИХ распределения в органической матрице позволяет управлять физико-химическими свойствами получаемых композитных материалов. Широкое распространение в качестве наполнителей получили углеродные структуры, такие как нанотрубки, графен, оксид графена (ОГ) и другие материалы, которые проявляют уникальные свойства, обусловленные размером в нанометровом диапазоне. С другой стороны, для создания механически прочных композитов находят применение подходы, основанные на принципах биоподобия, то есть воспроизводящие процессы биоминерализации. Например, осаждение карбоната кальция в пористых органических материалах позволяет получить композиты с улучшенными механическими характеристиками, схожими с ракушками моллюсков и костями. Для формирования мультислойных композитных пленок и контейнеров на их основе указанные подходы в комбинации с техникой последовательной адсорбции полиэлектролитов (ЛБЛ) могут обеспечить создание новых материалов с заданными свойствами (оптическими, механическими И др.). Подобные нанокомпозитные материалы перспективны в различных областях науки и техники, включая актуальное направление создания микроразмерных контейнеров для транспортировки биоактивных веществ. Однако, хранения И связь технологических условий получения и состава подобных нанокомпозитных материалов с их свойствами в литературе описана недостаточно в связи с большим числом новых материалов (таких как графен) и подходов к их получению.

В связи с этим, для создания композитных материалов с заданными свойствами и структур на их основе необходимо проведение исследований, направленных на изучение структуры и свойств композитов на основе наноразмерных материалов, механизмов и закономерностей процессов, протекающих при их формировании.

Степень разработанности темы исследования. В настоящее время разработка нанокомпозитных материалов занимает приоритетное место в материаловедении. Особый интерес вызывают углеродные наполнители, такие как углеродные нанотрубки и графен, меньшее распространение на настоящий момент получили углеродные наноточки. Однако, перенос выдающихся характеристик таких наполнителей в супрамолекулярных масштабах на объемные материалы остается сложной задачей, решение которой кроется в структурировании наполнителей в матрице. Разнообразие практических применений, на которые направлены такие материалы и, соответственно, в требуемых свойствах, вызывает огромную вариацию в методах синтеза таких материалов. Несмотря на выдающиеся свойства углеродных наполнителей и отдельные успехи, например, в электрофизических свойствах основанных на них композитных материалов, комплекс свойств таких материалов пока не позволяет получить их широкого распространения в технике.

Одним из самых перспективных и малоразвитых направлений применений нанокомпозитных материалов является биомедицина, где внедрение дистанционно управляемых материалов является ключевым элементом для повышения качества терапии патологий. В частности, широкий интерес вызывает разработка методов управления системами доставки лекарств внутри организма с контролируемым профилем и участком высвобождения действующих веществ в организме, что требует высокой чувствительности к физическим воздействиям, проникающим через ткани организма. Активно исследованы системы, обладающие высокой чувствительностью к магнитным полям и оптическому излучению, которое, способно однако, не проникать через ткани, но количество работ, демонстрирующих чувствительность к излучению в инфракрасном диапазоне, особенно во втором биологическом окне прозрачности (длина волны более 1000 нм), остается малочисленным.

Методы синтеза наноструктурированных материалов и микроконтейнеров на их основе с высокой механической стабильностью и чувствительностью к инфракрасному излучению и электрическим полям могут найти применение для создания систем управляемой доставки биоактивных веществ в организме.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является создание нанокомпозитных пленок и микроконтейнеров на основе полиэлектролитов и неорганических наноструктур методом последовательной адсорбции и выявление связи между условиями получения и физико-химическими свойствами образующихся композитов.

Для достижения поставленных целей были сформулированы следующие задачи:

- Сформировать пленки, состоящие из полиэлектролитных матриц различного состава с неорганическими включениями карбоната кальция с настраиваемыми упругостью и пределом прочности, используя методы биоподобия и последовательной инфильтрации пленки неорганическими солями.
- Показать возможность управления упругостью, прочностью и оптическими свойствами (включая поглощение и флуоресценцию) нанокомпозитных мультислойных пленок и полых микроконтейнеров на их основе допированием их различным числом слоёв оксида графена или углеродных наноструктур.
- 3. Провести математическую оценку механических деформаций нанокомпозитных микроконтейнеров под действием внешней нагрузки.
- Исследовать влияние температурного воздействия на физико-химические свойства полиэлектролитных микроконтейнеров различного состава (шероховатость поверхности, спектры возбуждения и флуоресценции, проницаемость оболочек для макромолекул в водных растворах).
- Исследовать влияние лазерного излучения видимого и ближнего ИК диапазонов на нанокомпозитные пленки, содержащие углеродные наноструктуры.

 Выявить возможность управления проводимостью и целостностью полиэлектролитных микроконтейнеров во внешнем электрическом поле путем модификации оболочки наночастицами магнетита.

Научная новизна.

В диссертационной работе было проведено систематическое исследование и получены экспериментальные результаты по влиянию состава и условий синтеза основе, образованных композитных пленок и микроконтейнеров на их полиэлектролитными комплексами и неорганическими частицами (такими как магнетит, оксид графена, карбонат кальция), на комплекс их свойств, включая такие как: морфология (под морфологией понимается совокупность факторов структуры поверхности, такие как шероховатость, пористость, присутствие агрегатов частиц), модуль Юнга, спектральные характеристики (спектры поглощения, возбуждения и флуоресценции), а также проницаемость пленок для модельных молекул. А именно, показано, что допирование мультислойных полиэлектролитных пленок (микроконтейнеров) оксидом графена приводит к качественному изменению морфологии поверхности, повышению модуля Юнга и предела прочности получаемых композитов, что позволило обеспечить механическую стабильность микроконтейнеров на их основе, а также оптическое поглощение в широком диапазоне.

Показано, что мультислойные полиэлектролитные пленки различного состава способны индуцировать зародышеобразование и последующий рост кристаллов карбоната кальция, что позволяет использовать биоподобные подходы для получения композитов с настраиваемым пределом прочности и модулем Юнга. Установлены оптимальные условия формирования минеральной фазы в полиэлектролитной матрице, приводящие к максимальному модулю Юнга композита.

Установлено, что термическая обработка полиэлектролитной мультислойной пленки приводит к появлению флуоресцентных свойств за счет образования в ее составе углеродных наноразмерных структур. Кроме того, показана возможность применения термического воздействия для управления проницаемостью

полиэлектролитной пленки и регулирования диффузии молекул внешней среды. Показано также, что проницаемость композитных микроконтейнеров, содержащих углеродные наноструктуры или наночастицы магнетита, можно регулировать воздействием лазерного излучения ближнего ИК-диапазона и электрического поля.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Установленные в работе закономерности между составом и условиями формирования нанокомпозитных полиэлектролитных пленок и их характеристиками (шероховатость поверхности, упругость, прочность, спектры поглощения и флуоресценции) обеспечивают возможность формирования пленок с заданными свойствами. Установлено влияние различных полей, включая термическое, оптическое и электрическое, на свойства сконструированных материалов (рисунок 1).



Рисунок 1 – Схема, иллюстрирующая пути управления физическими характеристиками композитных микроконтейнеров

Исследованные закономерности формирования нанокомпозитных мультислойных пленок являются принципиально важными в ряде задач, включая создание новых функциональных материалов, а также микроразмерных контейнеров для хранения и контролируемого высвобождения биологически активных веществ (рисунок 2).



Рисунок 2 – Схема, иллюстрирующая управление физическими и физикохимическими свойствами композитов варьированием их состава

Методология и методы исследования. Для синтеза мультислойных использован полиионной сборки композитов метод противозаряженных элементов. При этом неорганическая составляющая была включена либо на этапе послойной сборки пленок, либо при последующим пропитыванием пленки соответствующими элементами. Упругость и предел прочности объектов были исследованы методом наноиндентирования отдельных микроконтейнеров. Для оценки оптических свойств исследуемых систем были использованы конфокальная микроскопия и спектроскопические методы. Воздействие внешних факторов на композитные микроконтейнеры оценивалось методами сканирующей электронной микроскопии, спектрофотометрии, а также по цитотоксическому эффекту закапсулированного вещества.

Степень достоверности результатов работы. Применение спектра современных методов исследования с применением новейшего научного оборудования, верифицированного по международным стандартам обеспечения единства измерений, вместе с применением математических методов и статистической обработки результатов и единообразие получаемых результатов при использовании методов исследования, основанных на разных принципах обуславливают достоверность полученных экспериментальных результатов.

Личный вклад автора. Вклад автора состоит в самостоятельном выполнении представленных в диссертации экспериментальных исследований. Анализ литературы по соответствующей тематике, характеризация образцов комплексом инструментальных методов, а также систематизация и интерпретация экспериментальных данных были проведены автором.

Основные положения и результаты, выносимые на защиту.

1. Введение неорганической фазы, представленной карбонатом кальция, путем инфильтрации на основе принципа биоподобия полиэлектролитных пленок и микроконтейнеров различного состава с линейной зависимостью массовой доли карбоната кальция в пленке от числа циклов инфильтрации приводит к повышению модуля Юнга материала с максимумом при массовой доле карбоната кальция в 15±0,7%.

2. Модификация мультислойных полиэлектролитных пленок (микроконтейнеров) наноразмерными листами оксида графена в количестве от 1 до 3 слоёв, равномерно распределенных в пленке, повышает предел прочности композита и микроконтейнеров на их основе до 8 ГПа, а также позволяет управлять их оптическими свойствами (оптическим поглощением и флуоресценцией).

3. Отжиг мультислойной полиэлектролитной пленки состава (PSS/PAH)_n/DS приводит к формированию наноразмерных углеродных структур в ее составе и возникновению флуоресценции с пиком излучения на длине волны 450 нм.

4. Нагрев стенок мультислойных полиэлектролитных микроконтейнеров состава (PDADMAC/PSS)₄ до 60°С в водных растворах приводит к снижению их проницаемости на 28% и к соответствующему сокращению массопереноса низкомолекулярного модельного красителя Родамина Б через них.

5. Воздействие внешнего электрического поля на суспензию нанокомпозитных полиэлектролитных микроконтейнеров вызывает эффекты упорядочивания микрокапсул, деформацию оболочек контейнеров и логарифмическое снижение концентрации недеформированных микрокапсул в суспензии при увеличении фазы наночастиц магнетита.

Апробация результатов исследований. Основные материалы работы были представлены на следующих конференциях: международная конференция «Saratov Fall Meeting», 2014, 2015, 2017, 2019, 2020 г., Саратов; Всероссийская конференция «IX Всероссийская научная конференция молодых ученых «Наноэлектроника, нанофотоника и нелинейная физика», 2013, 2014 г., Саратов; международные конференции: «7th International "Nanoparticles, Nanostructured Coatings And Microcontainers: Technology, Properties» 2016 г., Томск, Россия; «6th International "Nanoparticles, nanostructured coatings and microcontainers: technology, properties» 2015 г, Саратов, Россия; «5th International "Nanoparticles, nanostructured coatings and microcontainers: Technology, Properties» 2014г, Гент, Бельгия; «5th Molecular Materials Meeting» Сингапур, 2015, 15th international conference on organized molecular films (ICOMF 15) Чеджу, Южная Корея, 2014; 4th International Conference on Environment, Chemistry and Biology ICECB Окленд, Новая Зеландия, 2015; международная конференция «14th international conference on materials chemistry (MC14)» 8-9 июля 2019, г. Бирмингем, Великобритания; «Patient-tailored biomaterials for tissue regeneration, combating microbial contamination and drug delivery», 2-4 сентября 2019, г. Ланкастер, Великобритания; международная конференция «Conference on bioinspired materials» 23-24 ноября 2020. Великобритания.

Гранты: Результаты были получены в рамках выполнения ряда грантов Российского научного фонда (14-12-00275 Исследование переноса заряда и спектров поглощения и фотолюминесценции в упорядоченных системах "наночастицы в органической матрице" и разработка физико-технологических основ для создания элементной базы молекулярной электроники; 16-13-10195 Углеродные наночастицы и материалы на их основе; 18-19-00354 Детектирование и сортировка объектов в кровотоке с целью фильтрации его от компонент систем адресной доставки лекарств и поиска редких диагностических объектов) и (14.Z50.31.0004 правительства PΦ Дистанционно-управляемые мегагранта наноструктурированные системы для адресной доставки и диагностики), а также в рамках стипендий президента Российской федерации для обучения за рубежом

(Лондонский университет Королевы Марии, Великобритания, 2018-2019 гг.) и правительства Сингапура «A*STAR research attachment program» (2015-2017 гг.). Работа была поддержана стипендиальной программой Президента российской федерации для аспирантов и молодых ученых (2019-2021 гг.). Разработка по теме диссертации получила поддержку по программке УМНИК в рамках конкурса Технократ (Роснано), проект "Разработка обратимого сенсорного элемента для определения рН среды на основе упорядоченных массивов микроконтейнеров с возможностью визуального экспресс-анализа" (2019-2021).

Публикации: По теме диссертации опубликовано 20 печатных работ, в том числе 10 статей в журналах перечня, рекомендованного ВАК.

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, 5 глав с выводами и списка литературы, количество страниц 136; список литературы содержит 137 наименований; количество рисунков 38.

ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Одним из главных трендов науки и техники сегодня является создание новых комплексных материалов с более совершенными, либо принципиально новыми структурными и функциональными свойствами. Для решения огромного спектра задач разрабатываются нанокомпозитные материалы, основанные на полимерных материалах, за счет большой вариабельности материалов и подходов к их организации.

1.1 Полиионная сборка композитных пленок и микроконтейнеры на их основе

Нанокомпозитные системы на основе полиэлектролитов и неорганических наполнителей являются перспективными для применения В системах микрокапсулирования веществ и систем их доставки. С начала 90х годов была опубликована масса работ, показывающие использование метода полиионной сборки с различными макромолекулами, включая биологические материалы, например, белков и ДНК. Их формирование основано на энтропийных реакциях противоположно заряженных полиэлектролитов или водородной связи между неионогенными макромолекулами, a коротких гидрофобных также на взаимодействиях. Обычно сборки процесс полиионной начинается С полианионного слоя, нанесенного на положительно заряженную поверхность с последующей адсорбцией поликатиона, обратного поверхностному заряду. Последовательная адсорбция противоположно заряженных полимеров приводит к стабильного образованию термодинамически комплекса состава поликатион/полианион в каждом цикле. В конечном итоге достигается мультислойная пленка, толщина которой может варьироваться от нескольких нанометров нескольких микрон в зависимости от задействованных ДО

полиэлектролитов, количества циклов осаждения и условий среды. При этом мультислойные пленки, обладающие разным поверхностным зарядом и составом, ΜΟΓΥΤ быть получены путем изменения плотности заряда на каждом полиэлектролите. Наиболее распространенными полиэлектролитами, используемыми в полиионной сборке, являются поликатионы поли(этиленимин) поли(аллиламингидрохлорид) (РАН), поли(L-лизин) (PLL), хитозан, (PEI), желатин В, аминодекстран, и сульфат протамина. Их можно комбинировать с различными полианионами, такими как поли(4-стиролсульфонат) натриевая соль (PSS), поли(акриловая кислота) (PAA), сульфат декстрана, карбоксиметилцеллюлоза, альгинат натрия, гиалуроновая кислота, желатин А, хондроитин, гепарин. Кроме того, с использованием метода полиионной сборки достигнут большой прогресс в разработке мультислойных нанокомпозитных материалов, благодаря возможности послойно задавать состав пленки на нанометровом уровне [1,2]. Помимо пленок состоящих из полиэлектролитов и белков так же были получены нанокомпозитные пленки, включающие наночастицы (НЧ) металлов и оксидов металлов [3], глин [4], углеродных [5] многих других наполнителей.

В настоящее время метод полиионной сборки широко используется для производства функциональных биосовместимых покрытий и ультратонких полых оболочек. Система доставки веществ может быть разработана путем включения слоев частиц лекарственного средства в ходе полиионной сборки. Выпуск лекарственного средства из таких комплексов затем достигается при разложении пленки с помощью определенных влияющих параметров, таких как изменение pH, температуры, окислительно-восстановительного потенциала, освешение определенной длинны волны или ферментативная деградация и многое другое [6]. Такие капсулы на базе полиэлектролитных комплексов могут также включать в себя готовые контейнеры меньшего размера с лекарственными средствами, что служит в качестве иерархических наносистемы. Полиэлектролитные комплексы, высвобождающие лекарственные средства в пределах 1-5 вес.% в течение 1-100 часов, были применены в качестве покрытий на костных имплантатах и участках

кожи [6]. В 1997-1998 годах подход по созданию нано- и микрокапсул был разработан группой в Институте коллоидов и поверхностей им. Макса Планка [7,8].

Метод основан на полиионной сборке противоположно заряженных макромолекул на коллоидных частицах. Когда частицы шаблона растворяются или разлагаются, мультислойные комплексы остается в виде суспензии полых оболочек. Диаметр оболочки зависит ОТ размера шаблонных частиц, использованных для формирования оболочки, и может варьироваться от субнанометровых размеров до нескольких микрометров. Толщина полимерного слоя на поверхности частицы также зависит от ряда параметров внешней среды, таких как концентрация солей и рН и от количества циклов нанесения полиэлектролитов и может составлять от нескольких нанометров до нескольких сотен нанометров. Эти многослойные оболочки могут быть изготовлены из множества различных макромолекул и других компонентов, таких как синтетические и природные полиэлектролиты, липиды и многовалентные красители. Таким образом, такие состав и свойства данных структур контролируются с высокой точностью, как это происходит в нанокомпозитных внешний формируя слой материалах. Например, оболочки полимером, содержащим реакционноспособные группы, такие как аминогруппы ИЛИ карбоксильные группы, затем можно дополнительно модифицировать поверхность такой оболочки определенными лигандами, репортерными группами или другими фрагментами для доставки лекарств с целевым назначением. Слабые полиэлектролиты являются очевидными кандидатами для формирования pHчувствительных капсул, которые могут быть обратимо загружены и разгружены целевыми веществами путем изменения рН внешней среды. Встраивание неорганических частиц в мультислойные оболочки придает дополнительную функциональность капсулам: так наночастицы металлов и оксидов металлов придают мультислойным оболочкам восприимчивость к свету и магнитному полю [9,10]. Сравнение полимерных многослойных капсул и альтернативных систем доставки [11] показывает, что полиэлектролитные микрокапсулы выгодно

отличаются тем, что могут быть адаптированы под широкий спектр задач, путем создания новых многофункциональных материалов с заданными свойствами.

1.2 Массивы микроконтейнеров на подложках

В разработке систем доставки веществ существует проблема создания систем с возможностью выпуска веществ в точно заданном участке пространства в небольших и точно определенных количествах. До настоящего времени наиболее распространенный подход используют микроэлектромеханические системы (МЭМС), такие как микронасосы, клапаны или электрохимически растворяющиеся [12]. Такие обеспечивают точный резервуары системы временной И пространственный контроль над процессом выпуска инкапсулированного вещества, однако, они требуют внешних компонентов, таких как источник питания и микрофлюидная система. Шкала размеров МЕМС обычно составляет порядка десятков микрон и выше. Кирюхин и др. продемонстрировали перспективный упорядоченных подход К созданию массивов полых микроконтейнеров, выполненных из мультислойных полиэлектролитных с возможностью выпуска инкапсулированного вещества посредством внешних воздействий [13].

Для синтеза массивов микроконтейнеров сначала необходимо изготовить шаблон с массивом микролунок на поверхности с последующей полиионной сборкой на его поверхности полиэлектролитной пленки. На данном этапе покрытые пленкой микролунки могут быть заполнены целевым веществом с помощью ряда методов, разработанных для твердых частиц или жидкостей [13]. Затем полученная структура склеивается с полиэлектролитной пленкой противоподложки с последующим удалением оригинального шаблона. Это достигается адгезией, вызванной давлением, приложенным к подложке, предварительно покрытой другой мультислойной пленкой [14]. Удаление оригинального шаблона

загруженных целевым веществом. Так же микроконтейнеры могут быть загружены целевым веществом и после процесса их формирования [13,15].

Дистанционное индуцирование разрыва оболочек отдельных микроконтейнеров на подложке позволяет осуществлять выпуск вещества заданным образом и может использоваться в самых разных областях, таких как доставка лекарств, выпуск биоактивных веществ для биохимических исследований на уровне отдельных клеток и т.д. Такой режим был показан с использованием сфокусированного лазерного излучения на длине волны, соответствующей максимуму поглощения плазмона наночастиц золота, которые были включены в оболочку микроконтейнеров в ходе полиионной сборки [15].

1.2.1 Полиионная сборка полиэлектролитных пленок на шаблонах

Процесс адсорбции полиэлектролитов как на внешней поверхности шаблона с массивом микролунок, так и на его внутренней поверхности внутри микролунок имеет решающее значение для успешного получения микроконтейнеров. Ряд факторов может привести к критической неравномерности толщины пленки. Внутри лунок образуется слишком тонкая полиэлектролитная пленка если выполняется одно из условия: (1) плохое смачивание поверхности шаблона растворами полиэлектролитов; (2) размер лунок меньше, чем размеры полиэлектролитных глобул, в результате чего полиэлектролиты физически не адсорбироваться (3)могут внутри лунок; истощение концентрации полиэлектролита внутри лунок из-за электростатического взаимодействия между глобулами полиэлектролита и заряженной поверхностью, либо из-за низкой скорости диффузии полиэлектролитных глобул внутрь микролунок. И, напротив, в лунках образуется более толстая полиэлектролитная пленка, чем на внешней поверхности, если неадсорбированные полиэлектролиты не полностью из микролунок на этапе промывки. Кроме того, должны быть приняты меры для удаления пузырьков воздуха из микролунок, например, путем ультразвуковой

обработки до полиионной сборки пленки. Использование полиэлектролитных растворов с высокой ионной силой помогает преодолеть истощение концентрации в микролунках, связанное с зарядом внешней поверхности шаблона, благодаря электростатическому экранированию. Кроме того, важными параметрами, в этом случае, являются время адсорбции полиэлектролитов, а также время и количество циклов промывки.

1.2.2 Загрузка массивов микроконтейнеров на подложке

Загрузка микроконтейнеров, полученных по описанной методике, может быть выполнена сразу после сборки полиэлектролитной мультислойной пленки на поверхности шаблона с использованием метода самоорганизации коллоидов, разработанного в работе [16]. Суть метода заключается в том, что при перемещении коллоида частиц, капиллярные силы, образованные структурой микролунок, частицы, удерживая образом, стремятся захватить ИХ, таким внутри микроконтейнеров. Максимальное количество частиц в микролунке зависит от отношения его размеров к диаметру частиц. Такой подход может быть очень универсальным, когда применяются пористые частицы с адсорбированными представляющими интерес. Если количество молекулами, таких частиц, размещенных в одной камере, достаточно велико, можно контролировать соотношение между различными компонентами в камере, смешивая различные частицы в заданном соотношении, каждая из которых несет один компонент. Таким образом, могут быть достигнуты конкретные биохимические смеси или ферментативные смеси для каскадных реакций.

1.2.3 Перенос массива микроконтейнеров

Для переноса полученной полиэлектролитной мультислойной пленки с шаблона на противо-подложку необходимо покрыть ее адгезивным материалом. Однако, к обычным адгезивам, требуются органические растворители или термическая обработка, что может быть губительно для загруженного в микроконтейнеры вещества. Кроме того, требуется достичь однородного нанометрового слоя адгезива для запечатывания лунок шаблона без проникания внутрь полости. Один из способов состоит в том, чтобы покрыть подложку многослойной пленкой состава PSS/PDADMAC и привести ее в контакт под давлением с внешней поверхностью полиэлектролитной пленки на шаблоне. Приложенное давление способствует адгезии между пленками, обеспечивая более сильную связь, чем у пленки с шаблоном [14]. Таким образом, оригинальный шаблон может быть удален, приводя к образованию массива полых микроконтейнеров. Условием сохранения миркроконтейнерами формы является их механическая прочность. Как было показано, высокая форма оболочки микроконтейнеров нарушается, приводя к контакту крышки с основанием, если их оболочка, тоньше, чем определенное критическое значение [17]. И напротив, механически стабильные микроконтейнеры образуются при использовании толстых оболочек.

Критическая толщина цилиндрической оболочки может быть оценена с помощью модели критического напряжения Эйлера для описания потери устойчивость контейнеров с последующим контактом крышки контейнера с основанием в качестве основного механизма коллапса [13]:

$$h_{cr}^{2} = \frac{a^{2}\sigma_{ad}\sqrt{3(1-v^{2})}}{2E}$$
(1)

где а - радиус цилиндра, σ_{ad} - сила адгезии полиэлектролитной оболочки к подложке, v - коэффициент Пуассона, Е - модуль Юнга оболочки. Модуль Юнга мультислойных пленок, образованных парой полиэлектролитов PAH-PSS, погруженных в воду, находится в диапазоне от 500 до 750 МПа [18,19]. Было установлено, что он не зависит от толщины пленки в широких пределах от 10 до 200 нм. Модуль Юнга многослойной пленки состава PDADMAC/PSS составляет 100 МПа, что измерено с помощью атомно-силового микроскопа [20]. Исходя из этих параметров, критические толщины были оценены как 300 и 1000 нм для цилиндрических контейнеров состава PAH/PSS, имеющих 7 и 25 мкм в диаметре, и 740 нм для микроконтейнеров диаметром 7 мкм, состоящих из более мягкой пары полиэлектролитов PDADMAC/PSS, что хорошо согласуется с экспериментальными данными [13,17]. Таким образом, варьируя геометрию шаблона, могут быть изготовлены упорядоченные массивы механически устойчивых микроконтейнеров, полых или заполненных целевым веществом.

1.2.4 Загрузка полых микроконтейнеров на подложке через оболочку

Альтернативным вариантом загрузки массивов полых микроконтейнеров является загрузка уже сформированных микроконтейнеров через оболочку с использованием растворителя. Изначально метод был разработан для загрузки полиэлектролитных микрокапсул, диспергированных в воде, с использованием в качестве загружаемого вещества масло с помощью промежуточных растворителей, таких как этанол или ацетон, совместимых как с водной, так и с масляной фазами [21]. В качестве примера подсолнечное масло можно наносить непосредственно на заполненные толуолом полиэлектролитные микроконтейнеры в течение 1 часа. Затем избыточное масло вымывают толуолом, и образцу дают высохнуть [13]. Этот метод может быть модифицирован для загрузки микроконтейнеров липофильными веществами, такими как производные перилена [15]. В дальнейшем загрузка микроконтейнеров может быть расширена до множества различных веществ, что может быть достигнуто управлением проницаемостью полилектролитных пленок с помощью множества влияющих параметров, например, pH, ионная сила, окислительно-восстановительный потенциал и т.д.[22]

1.3 Управляемый выпуск веществ

1.3.1 Электрохимические и электрические влияющие параметры

Электрически и электрохимически управляемые капсулы имеют широкие перспективы в микромеханических и биомедицинских применениях [23]. Эффект воздействия данных параметров на проницаемость полиэлектролитной оболочки активно исследуется [24,25]. Приложенное электрическое поле индуцирует приток низкомолекулярных противоионов к оболочке микрокапсул в суспензии и увеличивает осмотическое давление. Другой перспективной областью применения таких способ управления полиэлектролитными микрооболочками является сенсорика [26]. Кроме того, была показана возможность применения полиэлектролитных комплексов в электрокатализе: мезопористые пленки состава платина/палладий были получены с помощью электрохимического полиионного осаждения [27]; в другом подходе чередующиеся слои наночастиц золота и PAH полиэлектролита использовались В процессе полиионной сборке микрооболочек [28].

1.3.2 Температура

Использование температуры изменения проницаемости ДЛЯ полиэлектролитных пленок является одним из распространенных методов управления микрокапсулами. Сжатие или набухание полиэлектролитных микрокапсул с использованием термической обработки впервые было показано в работе [29]. При повышенных температурах многослойные пленки, собранные на твердых подложках, практически не меняют толщину. Однако, свободные мультислойные полиэлектролитные пленки, собранные на границе раздела

вода/воздух, сжимаются при нагревании в присутствии воды, что указывает на то, что содержание воды является важным параметром в этом процессе.

обработка Термическая приводит К значительным изменениям В многослойных оболочек проницаемости полых для высокомолекулярных соединений [30]. Кроме того, ряд работ свидетельствует также, что температурная обработка влияет аналогичным образом не только на капсулы, но также на блоксополимеры, мицеллы, наногели и наночастицы типа «ядро-оболочка». Повышенная подвижность полимеров в многослойных оболочках достигается при достижении специфической температуры стеклования, ДЛЯ различных Повышение полиэлектролитных комплексов. температуры обеспечивает достаточную преодоления порога, необходимого энергию для ЛЛЯ перераспределения полиэлектролитных цепей в мультислое. Сначала полимерные звенья становятся подвижными, а затем происходит либо сжатие, либо расширение капсулы, в зависимости от соотношения положительных и отрицательных зарядов в мультислое. При этом сжатие капсулы сопровождается усилением стенок. Было показано, что при нагревании микрокапсул (PDADMAC/PSS)₄ происходит реорганизация слоев полиэлектролита, что приводит к более плотной структуре [31].

Для осуществления инкапсуляции состав может быть скорректирован путем правильного выбора полиэлектролитных материалов и их состава, который приведет к эффективному сжатию капсулы под действием термической обработки. Следует отметить, что лучшее понимание подвижности и диффузии полимерных цепей имеет важное значение не только для получения капсул, но и для инициированного высвобождения их содержимого [32]. Несмотря на то, что температура является важным влияющим параметром для инкапсуляции и высвобождения биологически активных молекул это редко находит применение для внутриклеточного и *in vivo* контролируемого высвобождения лекарств, так как физиологических В условиях температура почти постоянна. Поэтому методы управления высвобождением инкапсулированного дистанционные вещества, основанные на внешних полях, являются более перспективными [33].

1.3.3 Ультразвук

Ультразвуковые волны были исследованы как инструмент для большого количества применений [34], включая высвобождение инкапсулированного вещества из капсул, полученных методом полиионной сборки, при их разрыве ультразвуковыми волнами высокой мощности [35]. Было показано, например, что капсулы с более плотными оболочками, содержащие неорганические наночастицы, были более чувствительны к ультразвуку. Самой большой проблемой в этой области является необходимость снижения мощности ультразвука с целью достижения безопасного уровня, разрешенного в медицинских приложения. Низкий уровень мощности, необходимый для разрушения, был достигнут для липосом при их адсорбировании на поверхности больших полиэлектролитных капсул [36].

1.3.4 Магнитные поля

Одним из основных применений полиэлектролитных оболочек со встроенными магнитными наночастицами является доставка, направляемая внешними магнитными полями. Львов продемонстрировал, что переменное магнитное поле также влияет и на проницаемость оболочек, если они содержат агрегаты наночастиц, встроенные в оболочку [37]. Наночастицы кобальта были включены в многослойные оболочки PSS/PAH в ходе процесса полиионной сборки, при этом проницаемость таких оболочек к молекулам декстрана в этот момент была пренебрежимо мала, но значительно увеличилась после применения переменного электромагнитного поля в течение 30 мин на частотах около 100-300 Гц, тем самым инициируя высвобождение инкапсулированного вещества. Катамари также продемонстрировал выпуск вещества из магниточувствительных капсул на основе полиэлектролитов, липидных слоев и магнитных наночастиц [38]. В этом случае высвобождение было связано с фазовым переходом липидной мембраны, вызванным локальным нагревом наночастиц Fe₃O₄ под действием магнитного поля. Функционализация полиэлектролитных оболочек одновременно магнитными наночастицами и наночастицами благородных металлов [39] открывает возможности использования нескольких влияющих параметров для выпуска инкапсулированного вещества.

1.3.5 Механическая деформация

В настоящее время механическое напряжение широко используется для измерения жесткости и механических свойств полиэлектролитных оболочек. В этой области были разработаны несколько структурных [40] и механических методов определения характеристик [20]. Необходимость изучения механической устойчивости полиэлектролитных микрооболочек была вызвана задачами, обнаруженными при их применении для внутриклеточной терапии [41], т.е. излишняя деформация оболочек и потери инкапсулированных молекул при внутриклеточной доставке. Усиление оболочек может быть достигнуто за счет включения наночастиц золота или углеродных нанотрубок [42].

Таким образом, изначально механические свойства полиэлектролитных оболочек изучались с целью повышения их прочности, но механическое давление может быть также использовано для выпуска инкапсулированного вещества. В литературе можно найти данные о нескольких режимах механических деформаций. Первый режим предполагает высвобождение, при надавливании на полиэлектролитную оболочку, которая впоследствии восстанавливает свою форму после снятия давления. Это явление связано с упругой (полностью обратимой) деформацией оболочек. Другой выпуска достигается пластической ТИП деформацией: давление разрушает оболочки необратимо.

Высвобождение инкапсулированного вещества из полиэлектролитных микрокапсул было всесторонне проведено с использованием комбинации атомно-

силового микроскопа с флуоресцентным микроскопом [43]. В данном подходе инкапсулированных флуоресцентных контроль молекул позволяет визуализировать высвобождение и измерять пороги пластической деформации. Для оболочек PSS/PDADMAC, состоящих из восьми слоев, высвобождение было индуцировано на при достижении 18% относительной деформации. При этом было установлено, что пластическая деформация оболочек начинается с относительной деформации около 20%. Недавнее исследование механической деформации полиэлектролитных оболочек, собранных на ядрах карбоната кальция, показало сложный характер полимерной матрицы, сформированной на этих пористых микрочастицах, но все же можно было оценить силы, необходимые для инициирования высвобождения из оболочек, содержащих различные число слоев [44].

1.3.6 Лазерное излучение

Лазерный свет является эффективным инструментом дистанционного высвобождения инкапсулированных веществ [45]. Стоит отметить, что для биомедицинских применений важен выбор длины волны, поскольку свет должен быть минимально поглощен клетками и тканью. Этим требованиям удовлетворяют лазеры, работающие в ближней инфракрасной области (ИК) оптического спектра [46]. Было показано, что полиионные слои, содержащие наночастицы благородных металлов являются светочувствительными [47], и разрыв оболочек образованных мультислоями подобного состава объяснялся локализованным нагревом наночастиц, облученных в пределах их полос поглощения. Концентрация может быть варьирована путем регулирования состава микрокапсул [48], в то время как управление концентрацией и состоянием наночастиц в оболочках может быть осуществлен с помощью полимеров и условий их адсорбции [49]. С одной стороны, эти шаги позволяют улучшить поглощение полиэлектролитных оболочек в ближней инфракрасной области, делая оболочки чувствительными к свету в этом диапазоне. С другой стороны, они позволяют локализовать тепло И минимизировать потенциальные побочные эффекты. Выпуск инкапсулированного вещества из полимерных многослойных капсул при лазерном облучении был исследован в ряде работ [50]. При этом лазерное излучение было использовано не только для выпуска инкапсулированного вещества, но и для его инкапсуляции [51]. В этом случае инкапсулирование было связано с перераспределение полимерных цепей и изменениями в проницаемости полиэлектролитных оболочек после воздействия света. При этом было показано, что эффективность оптического инкапсулирования возрастает с увеличением времени облучения [52]. Позднее были продемонстрированы возможности контролируемого выпуска инкапсулированного вещества из многослойных многослойных капсул [53]. После перестает генерироваться, и полимерный прекращения облучения тепло многослойный материал возвращается в так называемое «стекловидное» (или неподвижное) состояние, в котором является непроницаемым. Стоит отметить, что длина волны может быть тонко подстроена при использовании металлических наностержней в многослойных оболочках [54]. Ерохина и др. использовали бактериородопсин, встроенный в полиэлектролитные оболочки в качестве светопоглощающего белка, генерирующего протоны [55]. При воздействии света наблюдается падение pH, что увеличивает проницаемость полиэлектролитных оболочек образования за счет пор, что приводит К высвобождению инкапсулированного флуоресцентного красителя. Другой интересный метод высвобождения инкапсулированного вещества из полиэлектролитных оболочек посредством света использует подход, разработанный для фотодинамической терапии [56]. Стоит отметить, что внутриклеточная доставка является важной областью применения полимерных мультислойных капсул [57]. Клетки могут поглощать микрокапсулы путем спонтанного фагоцитоза или с помощью электропорации, которая работает даже для капсул микронного размера. Было так же показано, что термически обработанные полиэлектролитные оболочки достаточно устойчивы, чтобы выдерживать давление клеток при их поглощении. Возможность внутриклеточного вскрытия микрокапсул была показана следующим

образом: мультислойные капсулы, нагруженные пептидами, были введены в среду с клетками Vero (клетки эпителия почки, взятой у африканской зеленой мартышки) и СНО (клетки яичника китайского хомяка), после чего клетки были освещены импульсом ИК-лазера с высвобождением пептидов непосредственно внутри клеток [58]. Кроме того, были опубликованы работы, описывающие эксперименты по дистанционному выпуску инкапсулированного вещества лазерным излучением в ближней ИК области в нейронах [59]. Локальный нагрев полиэлектролитных капсул, содержащих небольшое количество наночастиц, включенных в оболочку, отрицательного как было подтверждено, не оказывает И. влияния на жизнеспособность клеток.

1.3.7 Выпуск вещества из массива микроконтейнеров на подложке

Удаленный выпуск вещества из таких микроконтейнеров был проведен с оболочек помощью разрыва отдельных контейнеров посредством фокусированного лазерного излучения [15]. Включение металлических наночастиц в полиэлектролитную оболочку делает его чувствительным к облучению в полосе поглощения плазмона этих наночастиц. Энергия поглощаемого света рассеивается в виде тепла, что приводит к высоко локализованному повышению температуры в оболочке, разрушая окружающую полиэлектролитную пленку толщиной около 480 нм, таким же образом, как это было показано ранее для полиэлектролитных несколько микрокапсул толщиной В HM [48]. Захваченные частицы высвобождались из выбранных камер сфокусированным светом 532 нм, второй гармоникой импульсного Nd-YAG-лазера. Микрокамеры заполнены водой, поскольку частицы проходят броуновское движение внутри камер, не покидая его. После того, как на выбранную камеру воздействует лазерный импульс, многослойные колпачки падают с последующим высвобождением ранее размещенных частиц. Между тем соседние камеры остаются неповрежденными.

1.4 Нанокомпозиты на основе оксида графена

На сегодняшний день использование нанокомпозитных материалов на основе полимерных матриц с неорганическим наполнителем приобрело повсеместный характер. Полимерные композиты изготавливаются коммерчески многих разнообразных применений, включая спортивные лля товары, аэрокосмические компоненты, автомобили и т. д. а последние 20 лет особое внимание уделяется разработке полимерных нанокомпозитов, где как минимум одна из размерностей наполнителя материала имеет размер до 100 нм. Совмещение свойств полимерной матрицы и неорганики позволяет получить материалы с уникальными оптическими, механическими, электрофизическими и многими другими свойствами. Более того, переход от микроразмерных объектов к наноразмерным сопровождается рядом размерных эффектов, приводя к резкому изменению физических свойств материала, сильно отличающихся от свойств объемного материала, что связано с тем, что наноразмерные материалы имеют большую площадь поверхности при заданном объеме [60]. Таким образом, наноструктурированный материал может иметь существенно отличающиеся свойства от объемного материала того же состава. В общем случае усиление свойств наноматериалов обеспечены пропорциями компонентов [60], а так же общими размерами фаз компонентов и степень смешивания фаз между собой.

Композиционные свойства материала значительно меняются с изменением параметров их образования и структуры компонентов матрицы и наполнителя, которые могут быть слоистыми, волокнистыми и другими [61].

Рисунок 3 показывает несколько вариантов композиции материалов, основанных на силикатах. В общем случае в таких материалах происходит интеркаляция – проникание полимерной матрицы между слоями наполнителя. Однако возможно ситуация, когда такое проникновение не происходит, что приводит к формированию композита с отдельными фазами, что обуславливает свойства, сравнимые с обычными композитами [62]. Интерколяция приводит к формированию композита с мультислойной структурой, где наполнитель равномерно распределен в полимерной матрице, что в предельном случае приводит к формированию расслоенной структуры композитного материала. При чем каждая структур отличается существенно различными физическими свойствами результирующего композита. Аналогично, в полимерных нанокомпозитах, усиленных волокнами или частицами, распределение наночастиц и адгезия на границе раздела частиц с полимерной матрицей оказывают огромное влияние на механические свойства нанокомпозитного материала.



Рисунок 3 – Схема трех основных типов композитов на базе слоистых силикатов в полимерной матрице: а) раздельные фазы; b) интеркаляция (нанокомпозит); c) расслоенная структура (нанокомпозит) [62]

Без качественного распределения частиц в материале не будет происходить усиления механических свойств по сравнению с микрокомпозитами, и более того,

плохо диспергированный наполнитель в матрице может ухудшить механические свойства [63]. Используя различные наполнители и способы их распределения в полимерной матрице, достигаются улучшения определенных свойств композита, значительно отличающихся от свойств объемного материала. Включение наполнителей с высоким модулем упругости в низкомодульную полимерную матрицу является общепринятым подходом, который позволяет синтезировать нанокомпозитные материалы с высоким модулем Юнга и пределом прочности, зачастую основанным на биоподбных подходах. Зачастую для разработки конкретных протоколов синтеза нанокомпозитных материалов берут такие природные материалы как кости [64] и ракушки моллюсков [65]. Однако, стоит отметить, что современные материалы, особенно основанные на углероде нашли широкое применение В нанокомпозитных материалах И демонстрируют удивительные механические свойства, к таким материалам относится широкий спектр углеродных материалов, таких как углеродные нанотрубки и графен, которые особенно выгодны для различных областей благодаря их уникальным оптическим, механическим, электрическим и другим свойствам [66]. Стоит отметить, что графен играет важную роль в создании новых механически прочных композитов, являясь самым прочным из когда-либо испытанных материалов с модулем Юнга 1,0 ТПа [67]. Графен привлек широкое внимание сразу после того как был впервые был получен в виде отдельных монослоев в 2004 году [68], что изначально считалось невозможным из-за термодинамической неустойчивости одноатомных слоев кристаллов [69]. Однако, впоследствии было показано, что графен стабилен и обладает выдающимися электронными и механическими свойствами (подвижность носителей заряда 250 000 см² В⁻¹с⁻¹ 1 при комнатной температуре [70], теплопроводность 5000 Вт м⁻¹ К⁻¹ [71], и механическая жесткость 1 ТПа [67]. Важно отметить, что графен может производиться в объемных количествах с использованием простых механических и химических процессов. ОГ имеет более низкие механические характеристики по сравнению с чистым графеном из-за разрушения структуры при окислении [72], например, его прочность на разрыв уменьшается в два раза [73]. Несмотря на это, ОГ широко

применяется для усиления полимерных композитов, поскольку обладает структурой в виде листа ковалентно связанных атомов углерода, несущих функциональные группы кислорода (например, гидроксильные, различные эпоксидные и карбонильные группы) на базальных плоскостях и краях, что облегчает его диспергирование в водных растворах и улучшает связывание с полимерными матрицами [74]. Отдельные листы оксида графена могут быть получены в результате расслоения объемного оксида графита. Для синтеза оксида графита процедуры были разработаны несколько десятилетий назад, наиболее представлены работах распространенные ИЗ которых В Броди [75], Стоденмайера [76] и Хаммера и до сих пор остаются распространенными в модифицированном виде. Окисление графита до оксида графита разрушает sp²гибридизованную структуру графеновых листов, создавая дефекты [77], и увеличивают расстояние между соседними листами от 3,35 А° в графитовом порошке до ~6,8 А° для порошка оксида графита [78]. Повышенное расстояние между отдельными слоями кристалла облегчает механическое разделение оксида графита на отдельные графеновые листы. Высокое отношение поверхности оксида графена к объему в сочетании с его высокой диспергируемостью как в воде, так и органических растворителях препятствует агрегации И способствует В значительному взаимодействию между наполнителями и полимерами при синтезе композитов. В ряде работ показано, что термическая стабильность [79] и электрические свойства [80] полимерных материалов могут быть значительно улучшены за счет включения листов оксида графена в структуру. Несмотря на то, что теоретические работы показывают, что одиночный лист оксида графена имеет высокую механическую прочность (предел прочности около 63 ГПа), что было показано расчетами методом Монте-Карло [73], в последнее время мало работ касалось использования оксида графена в качестве эффективного наполнителя для усиления механических свойств полимерных нанокомпозитных материалов [79]. Был показан метод синтеза прочного слоистого материала на основе оксида графена [72], основанный параллельном расположении листов оксида графена в потоке, вызванным вакуумной фильтрацией, что приводит к образованию

сверхпрочного бумагоподобного материала со слоистой структурой. К сожалению, этот материал является хрупким, и он ломается при небольшом удлинении. С другой стороны, было широко исследовано, что композиты полимеров и нанонаполнителей могут сочетать вязкое свойство полимерной матрицы и высокую прочность нанонаполнителей [80]. Учитывая низкую концентрацию функциональных групп на поверхности чистых углеродных материалов, формирование ковалентных связей между полимерной матрицей и такими материалами (при использовании в качестве составного наполнителя) может быть довольно сложной задачей. Однако, листы оксида графена содержат поверхностнобогатые нереакционноспособные функциональные группы в виде различных оксидных групп, и был продемонстрирован целый ряд подходов для введения ковалентных связей между наполнителем в виде оксида графена и полимерными матрицами. Можно выделить два типа композитов на основе ОГ в полимерной матрице: объемные полимерные композиты с ОГ и слоистые ОГ-содержащие полимерные пленки. Полимерные композиты с наполнителем в виде ОГ синтезируются путем смешивания растворов [81], смешивания в расплаве [82], и полимеризации in situ [83]. Такие материалы проявляют высокий модуль Юнга, а также улучшенные электрические свойства [79]. Например, поливиниловый спирт, содержащий 3 мас.% оксида графена, имеет модуль Юнга 4,8 ГПа и прочность на растяжение до 110 МПа. Однако, неупорядоченная ориентация листов оксида графена в композитах такого типа приводит к высокому относительному движению между ними и полимерной матрицей при внешнем механическом давлении, что приводит к понижению эффективности переноса напряжения. Эта проблема может быть уменьшена путем химического сшивания этой структуры. Показано, что в этом случае модуль Юнга композита увеличивается на 900% [84]. Одним из самых распространённых методов получения слоистых пленок состава оксид графенаполимерная матрица является последовательное спин-покрытие [85]. Полученные таким образом пленки состава ОГ-поли(3-гексилтиофен)/фенил-С61-масляная кислота демонстрируют эффективный перенос напряжения с полимера на слои высокомодульных листов оксида графена [86].

1.5 Биоминерализация

За последнее десятилетие было разработано множество методов синтеза бимолекулярных систем в комбинации с тонкими пленками на основе химии поверхностей [87]. Однако, мало работ посвящено исследованию механически прочных ЛБЛ композитов, основанных органических на матрицах с неорганическими компонентами, аналогичных природным материалам, таким как перламутр [88]. В ряде научных работ продемонстрировано использование ЛБЛ пленок для индуцирования рост неорганической фазы, согласно биоподобным процедурам, и показан рост нано- и субмикронной фазы неорганики в пленке со свойствами, близкими к керамическим материалам, которые синтезируются в природе при помощи живых организмов, например, раковины моллюсков и другие материалы на основе процесса биоминерализации [89]. Процесс биоминерализации формированию комбинации биологических приводит К макромолекул и неорганического компонента, обеспечивающей высокоэффективную передачу механических нагрузок и, как следствие, высокую твердость и высокий предел прочности [90]. Целый ряд новых нанокомпозитных материалов для различных отраслей науки и технологий был основан на данном подходе [91,92]. Стоит отметить, что подобный подход к структурированию компонентов в материале позволяет получать и уникальными оптические свойства [93]. Попытки комбинации различных функциональных элементов в одном материале привела к появлению спектра уникальных разработок [94]. Дальнейший прогресс был достигнут в исследованиях тройных искусственных перламутровых материалов с перспективами применения в области аэрокосмических исследований, гибких электродов для супер конденсаторов и в тканевой инженерии [95]. Интерес в разработке новых функциональных материалов позволил достичь высокого уровня понимания механизмов, лежащих в основе процесса биоминерализации и позволил разработать протоколы синтеза материалов на основе принципа биоподобия [96]. Так. было показано, что образование зародышей и последующий рост неорганической фазы является комплексным процессом, но в высокой степени определяется не только структурными биологическими макромолекулами, но также и растворимыми биополимерами [97]. Примером такой структуры могут морские раковины, призматические структуры кальция которых служить содержатся в полимерной матрице из белков и глицина с включением внутрь неорганических призм волокон хитина. При этом растворимые кислотные белки имеют большое значение в процессах зародышеобразования минеральной фазы и в процессах адсорбции неорганических элементов на поверхность матрицы [98]. Структура перламутра составлена мезокристаллическими пластинами аргонита с включением полимерных волокон между нанокристаллами [99]. Исследования показали, что аморфная фаза неорганической составляющей оказывает большое влияние на процесс минерализации в начальной фазе [100]. При этом аморфный прекурсор перемещается к участкам зародышеобразования в полимерной матрице посредством везикул [100], отчасти этот механизм подтверждается обнаружением аморфного фосфата кальция в костях и эмбрионах рыб [101], а также в большом количестве в кальцинированном эпидермисе членистоногих [102]. Используя в качестве примера композит карбоната кальция и полимера морских ракушек были разработаны несколько подходов к синтезу биподобных гибридных композитов состава неорганика-полимерная матрица аналогичные природным перламутрам [103]. Формирование карбоната кальция в различных полиморфных модификация было отмечено как результат действия структурных полисахаридов (например, хитин) и кислотных полимеров, совокупное действие которых определяло и позволяло контролировать рост наноразмерных кристаллов ватерита в тонких пленках [104]. Было обнаружено, что кристаллографические параметры карбоната кальция, формируемого в результате биоменирализации определяется природой и интервалами функциональных групп полимера в матрице [105]. Например, матрица из полиакриловая кислота в результате процесса биоминерализации позволяет формировать аргонит, а полиглумаиновая кислота – ватерит. Приведенные исследования показали способность контролировать с высокой точностью процессы образования неорганической фазы в полимерной матрице на основе

принципов биоподобия посредством полимерных матриц. Однако, использование полиэлектролитных мультислойных пленок, полученных методом последовательной адсорбции, не было показано для зародышеобразования и формирования минеральной фазы, такой как карбонат кальция и фосфат кальция.

Однако, стоит отметить, что перспектива использования полиэлектролитных пленок для использования в качестве матрице в процессах биоминерализации обусловлена рядом факторов. Во-первых, ЛбЛ пленки позволяют формировать мультислойные структуры с контролируемой пористостью на макроуровне. Вовторых, изменение ионной силы окружающего раствора могут приводить к изменению пористости и связи полиэлектролитных цепей. Таким образом, формирование неорганической фазы в значительной степени определяется вышеперечисленными факторами, что показывает принципиальную возможность их использования в качестве инструментов контроля над процессом роста неорганической фазы в полимерной матрице. Такие факторы, как ионная сила в процессе образования кристаллической фазы в полимерной матрице, а также состав и структура самой матрицы, которые в свою очередь зависят от множества факторов окружающего раствора, позволят изучить влияние этих параметров и сделать вывод о их варьировании в качестве инструмента управления ростом нанокристаллической фазы и смоделировать природные процессы.
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Материалы

Следующие полимеры были получены из Sigma Aldrich со степенью очистки х.ч.: Поли(аллиламина гидрохлорид) (РАН, 15 кДа), Поли(стиролсульфонат) натрия (PSS, 70 кДа), Полидиаллилдиметиламмония хлорид (PDADMAC, 20 wt % водный раствор, 100-200 кДа), Полиэтиленимин (PEI, 25 кДа), сульфат декстрана натриевая соль (DS, 9-20 кДа), Поли-L-аргинин гидрохлорид (PArg, MW> 70 000). Также следующие низкомолекулярные реактивы были получены из Sigma Aldrich хлорид кальция, карбонат натрия, гидрокарбонат натрия, хлорид натрия, флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ), тринатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), полиорганосилоксан Sylgard 184 (США) (ПДМС). Фермент α-химотрипсин, полученный из бычьей поджелудочной железы, был приобретён в Merck. Для проведения экспериментальной работы, приведенной ниже была использована деионизованная вода, полученная с использованием установки водоочистки Millipore Milli-Q Plus (США). В качестве подложек были использованы полированные легированные бором кремниевые пластины (толщиной 675 мкм) (Syst Integration Pte Ltd.). Химически чистая соляная кислота HCl была заказана из Merck и использована во всех экспериментах без дополнительной очистки. Фталоцианин цинка (Холосенс) любезно предоставлен Институтом органических промежуточных продуктов и красителей (Москва, Россия).

2.2 Производство шаблонов с массивом микролунок

Силиконовые штампы двух форм были изготовлены стандартным методом литографии и травления. Первая форма представляет собой массив столбиков в

виде усеченных конусов высотой 4 мкм и диаметрами оснований 7 и 10 мкм. Вторая форма представляет собой массив усеченных квадратных пирамид высотой 10 мкм со сторонами оснований 12 и 15 мкм.

Для формирования шаблонов штампы были залиты полимерным прекурсором ПДМС и сшивающим агентом в соотношении 10:1 и обработаны при 80 °C в течение нескольких часов. В результате получали шаблон с негативной копией штампа в виде массива микролунок соответствующей геометрии.

2.3 Синтез композитных мультислойных пленок на поверхности ПДМС шаблонов

Для сборки композитных мультислойных пленок был использован метод полиионной сборки с помощью робота (Riegler & Kirstein GmbH, Germany). Перед нанесением пленки ПДМС штампы были обработаны в ультразвуковой ванне и затем помещены в раствор PEI в концентрации 2 мг/мл (со смещенным pH до 5,5 с использованием одномолярного раствора соляной кислоты) на 15 минут для формирования положительно заряженного полимерного слоя. Далее, поочередно наносились слои PSS и PAH или PDADMAC с тремя циклами промывки в деионизованной воде после каждого слоя для удаления неадсорбировавшихся макромолекул. Адсорбция полиэлектолитов была проведена и использованием двух молярного раствора хлорида натрия, концентрация полимеров составляла 2 мг/мл, pH~5,5, каждый слой наносился в течение 15 минут. Последним слоем всегда был PSS.

2.4 Биоподобная минерализация

После полиионной сборки полиэлектролитной пленки на поверхности шаблона – они были сохранены гидратированными и затем была проведена

последовательная инфильтрация неорганическими прекурсорами, а именно одномолярными водными растворами солей хлорида кальция CaCl₂ и карбоната натрия Na₂CO₃. Шаблоны с полиэлектролитными пленками были выдержаны в каждой соли в течение 30 минут с последующими тремя циклами промывки для удаления капель растворов из пленки. Количество циклов инфильтрации составляло 1, 10, 20, 40 и 60.

После процесса инфильтрации полиэлектролитная мультислойная (ПЭМ) пленка была склеена с противо-подложкой, полированный кремний, покрытый мультислоем (PSS/PDADMAC)₄ для лучшей адгезии. Склеивание проводилось в течение двух часов при комнатной температуре под давлением в 1 МПа. После склеивания ПДМС шаблон был механически удален, открывая ПЭМ пленку.

2.5 Сканирующая электронная микроскопия

Для изучения морфологии получаемых структур был использован метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Изображения были получены на приборе FESEM 6700F (JEOL, Япония) при 5 кэВ, оснащенные приставкой для энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии образцов, которая в свою очередь проводилась при 15 кэВ. Перед измерениями, все образцы были покрыты слоем золота толщиной 10 нм для формирования проводящей поверхности.

2.6 Термогравиметрический анализ

Содержание неорганической фазы в полиэлектролитной пленке было определено методом термогравиметрического анализа на установке TGA Q500 (TA Instruments). Для этого 1-2 мг образца было снято с подложки и помещено в алюминиевый тигель, после чего образец разогревался до 900 °C со скоростью 20 °C в минуту в потоке кислорода.

2.7 Наноиндентирование

Для оценки механических свойств микроконтейнеров был проведен анализ методом наноиндентирования на установке Agilent Nanoindenter XP, оснащенный острым бриллиантовым зондом Берковича (с закруглением иглы около 50 нм). Для этого зонд располагался над крышками отдельных микроконтейнеров и, впоследствии, прикладывалась сила с постоянной скоростью возрастания, задерживалась на определенное время на пиковом значении и затем производилась разгрузка на той же скорости. Были использованы скорости 0,03 мH/с; 0,07 мH/с; 0,66 мH/с; 1,2 мH/с, все измерения проводились в течение 15 секунд, таким образом, скорости соответствуют максимальным приложенным силам 0,5 мH, 1 мH, 10 мH и 20 мH. Для каждого образца были протестированы 5 отдельных микроконтейнеров при каждой скорости и затем взято среднее значение, полученных кривых зависимости деформации от приложенной силы.

2.8 Синтез оксида графена

Квазидвумерный графена был оксида синтезирован согласно модифицированному методу Хаммера. Для этого 1 часть порошка графита была диспергирована в смеси 98 % H₂SO₄, 90 % HNO₃ и 85 % H₃PO₄ растворов (в соотношении 67,5:22,5:10, соответственно). Затем 6 частей водного раствора КМпО₄ был добавлен и раствор был экспонирован при 40-50 °С около двух часов и затем было медленно добавлено 100 частей деионизованной воды при 80 – 90 °C в течение часа. После этого было медленно добавлено 15 частей 30% раствора H₂O₂ при постоянном перемешивании. Для удаления нежелательных ионов и кислот был проведена фильтрация с помощью вакуумной фильтрационной установки, снабженной воронкой Бюхнера. Оксид графита, полученный после промывки 10% раствором соляной кислоты, был промыт дистиллированной водой до достижения

нейтрального значения pH, что занимает около двух часов. Далее, раствор был обработан в ультразвуковой ванне в течение 30 минут для лучшего расслоения оксида графита. Двухступенчатое центрифугирование применено для разделения расслоившегося и не расслоившегося оксида графита. Сначала для разделения целевого вещества и надосадочной жидкости было применено центрифугирование при 800 оборотах в минуту в течение 15 минут что позволило разделить фазы и удалить оксид графита, не подвергнувшийся расслоению. Затем, полученную надосадочную жидкость, являющуюся суспензий графена центрифугировали на более высоких скоростях, вплоть до 11000 оборотов в минуту в течение часа что позволило промыть образовавшийся графен и удалить излишки продуктов реакции из смеси.

2.9 Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

Визуализация проведенных экспериментов была осуществлена методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) с помощью установки Leica TCS SP8 X (Leica Microsystems, Германия), оборудованной иммерсионным объективом, обеспечивающим стократное увеличение (апертура 1,4). Установка снабжена четырьмя лазерами с длинами волн возбуждения: 405, 514 и 633 нм.

2.10 Вскрытие микроконтейнеров

Для вскрытия микроконтейнеров с помощью лазерного излучения была использована импульсная установка OPO Nd:YAG с перестраиваемой длиной волны. Были использованы длины волн 500, 800, 1000, 1200 и 1500 нм с соответствующими мощностями 300, 100, 50, 40, 20 мВт при частоте импульсов 10 Гц. Лазерный пучок был сфокусирован на образцы в пятна диаметром от 3 до 250 мкм.

2.11 Получение микроконтейнеров в виде суспензии

микроконтейнеры Полые мультислойные были получены методом последовательной адсорбции противоположно заряженных компонентов на коллоидных частицах карбоната кальция с характерным размером от 2 до 5 мкм. Такой подход был выбран благодаря широчайшей вариативности в материалах, которые могут быть использованы для синтеза микрокапсул. Так как практически любые заряженные элементы могут быть включены в полиэлектролитную матрицу, включая наночастицы, волокна, кластеры И другие вещества, а также макромолекулы. При этом структура микроконетейнера может быть задана посойна с нанометровой точностью, что открывает возможности для синтеза микроконтейнеров практически с любыми возможными свойствами. Для формирования оболочки микрокапсул были использованы растворы полиэлектролитов в концентрации 2 мг/мл в присутствии хлорида натрия концентрацией 0,5 М/л. После нанесения заряженного компонента на коллоидные частицы проводилась промывка суспензии деионизованной водой от несвязанных полиэлектролитов с помощью центрифугирования суспензии. На последнем этапе, после нанесения необходимого количества слоев, частицы карбоната кальция были растворены с помощью водного раствора ЭДТА в концентрации 0,2 М/л в получали суспензию результате чего полых полиэлектролитных микроконтейнеров. Были синтезированы суспензии микроконтейнеров состава (PSS/PDADMAC)₄ и (DS/PArg)₄ со средним размером 2,5 мкм. Термоусадка полученных микроконтейнеров была осуществлена при постоянном перемешивании при температуре 50 °C в течение 20 минут и 90 °C в течение часа для синтетического и биодеградируемого составов, соответственно. Для исследования связывания низкомолекулярного вещества в процессе термоусадки в модельного вещества был использован краситель родамин Б в качестве концентрации 0,33 мг/мл. Затем надосадочный раствор отбирался для последующего спектроскопического анализа, а суспензия микроконтейнеров

промывалась от несвязанного красителя минимум 5 раз. Размеры микрочастиц карбоната кальция и полиэлектролитных микроконтейнеров были определены с помощью СЭМ изображений, для этого проводилась серия из 20 измерений с последующим усреднением результатов.

2.12 Синтез микрокапсул

Полые полиэлектролитные микрокапсулы получали методом полиионной сборки (ЛБЛ), как описано ранее [8]. Сочетание биодеградируемых полимеров (декстрансульфат (DS) / поли-L-аргинин (PArg)) использовали для образования капсул, содержащих 4 бислоя состава [DS/PArg]₄.

Капсулы готовили с использованием микрочастиц СаСО3 в качестве матрицы. Микрочастицы CaCO₃ синтезировали путем смешивания 2 мл растворов CaCl₂ и Na₂CO₃ 1 М в соотношении 1:1 в течение 30 секунд при интенсивном перемешивании. Частицы CaCO₃ со средним диаметром 2 мкм затем собирали центрифугированием И промывали депонированной волой. Многослойные оболочки, содержащие 4 бислоя DS/PARG, поочередно собирали поперечно с использованием растворов 2 мг/мл DS в 0,5 M NaCl и 1 мг/мл PArg в 0,5 M NaCl с тремя стадиями промывки после осаждения каждый слой. DS был использован для формирования первого слоя. Эту процедуру повторяли 4 раза, что приводило к образованию четырех депонированных бислоев. Затем проводили обработку 0,2 М ЭДТА в течение 15 мин для извлечения СаСО₃. Полученные капсулы стабильны при длительном хранении.

2.13 Загрузка микрокапсул фотосенсибилизатором

Инкапсуляцию фталоцианина цинка (так называемый Холосенс) проводили путем термической обработки суспензии капсул. Суспензию микрокапсул,

содержащих целевое вещество, смешивали в различном соотношении. Суспензии капсул с переменными концентрациями повторно диспергировали в 1 мл водного раствора Холосенса (0,05 мг/мл). После 1 ч уравновешивания смесь обрабатывали при 80 °C в течение 60 минут вместе с перемешиванием (500 об/мин) для усадки капсул и, таким образом, для уплотнения оболочек. Термоусаженные капсулы хранили при комнатной температуре в течение примерно 10 мин для охлаждения, а затем капсулы собирали центрифугированием с последующим 4 циклами промывки с помощью воды для удаления несвязанных молекул целевого вещества. Первичный надосадочный раствор собирали для дальнейших измерений.

2.14 Выпуск фотосенсибилизатора из микрокапсул

Для исследования высвобождения целевых веществ суспензии, содержащие загруженные капсулы, замораживали при -20 °С и помещали в сушилку для сушки на ночь. Для растворения полимерных комплексов собранные порошки затем диспергировали в 1 мл фермента.

Для обеспечения оптимального операционного pH-фосфатного буферного физиологического раствора (1х, pH 7,4) использовали для получения раствора αхимотрипсина 1 мг/мл. Смеси помещали в 2 мл пробирки и выдерживали при 37 °C в течение 24 часов. После заданного времени инкубации нерастворенные полимерные комплексы осаждали путем центрифугирования. Собранный раствор анализировали с помощью флуоресцентной спектроскопии и участвовавшие капсулы снова ресуспензировали в растворе фермента.

2.15 Поглощение микрокапсул клетками

Клеточное поглощение меченых RhD6G микрокапсул анализировали на клетках HeLa (линия «бессмертных» клеток из раковой опухоли шейки матки) с

использованием проточного цитометра FACSCalibur и программного обеспечения HeLa BD CellQuest. Клетки высевали В 24-луночные планшеты лля культивирования клеток с плотностью 10000 шт/см² в 0,5 мл минимальной необходимой среды Дульбекко (DMEM, Sigma 51435C) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (10% FBS, Sigma F2442) и пенициллина стрептомицин (1%), соответствующий проходу клетки, и инкубировали в течение 24 часов. Затем среду заменяли на свежий раствор DMEM, содержащий меченые родамином 6G (RhD6G) микрокапсулы. После инкубации в течение 1, 2, 4 и 24 ч, чтобы обеспечить поглощение капсул клетками, клетки трижды промывали PBS (рН 7,4), подвергали действию фермента трипсин, центрифугировали и хранили в ледяной PBS до использования в проточной цитометрии. Клетки обрабатывали красителем Trypan Blue для гашения внеклеточной RhD6G-флуоресценции и для измерения только внутриклеточного сигнала RhD6G [106].

2.16 Противораковая фотодинамическая активность микрокапсул, загруженных фотосенсибилизатором

Клетки HeLa и NHDF (нормальные человеческие дифференцированные фибробласты) высевали в 96-луночный планшет для культивирования клеток при плотности клеток 10⁴ на каждую лунку. Каждая ячейка планшета была заполнена 100 мкл минимальной основной среды (МЭМ), которая содержала 10% объема эмбриональной бычьей сыворотки (FBS), 1% объема антибиотиков пенициллина, стрептомицина при 37°С и 5% атмосферы СО2. Через 24 часа культивирования в среду культуральную каждой лунки планшета добавляли дозу фотосенсибилизатора в виде раствора фталоцианина, а также суспензию биоразлагаемых капсул, загруженных фталоцианином. Суспензия [DS/PArg]₄ капсул после термообработки и контрольного образца была применена для инкапсулирования холосенса, как описано выше. Были получены и использованы микрокапсулы, нагруженные 0,9 ± 0,1 мкг холосенсом. Микрокапсулы,

загруженные холосенсом, добавляли в культуральную среду в соотношениях 5, 20, 40 и 60 микрокапсул на клетку и инкубировали в течение 15 часов, чтобы обеспечить поглощение капсул клетками. Соответствующие количества холосенса в качестве раствора использовали для проведения контрольных экспериментов. Впоследствии для уменьшения оптической плотности среды культуральная среда была заменена забуференным фосфатом физиологическим раствором (PBS). Каждая лунка планшета облучалась светоизлучающим диодом длиной волны 680 нм (Polironik, Москва, Россия) в течение 7,5 минут при интенсивности 4000 лм (соответствующая мощность 80 мВт/см²). После этого PBS снова заменяли на культуральную среду.

На последнем этапе в каждую лунку добавляли 10 мкл (10% объема) флуоресцентного красителя Alamar Blue для обнаружения жизнеспособных клеток с последующей инкубацией в течение 24 ч. Затем, методом спектрофлуометрии анализировали интенсивность флуоресценции образцов (возбуждение 540 нм, излучение 590 нм).

2.17 Антибактериальная фотодинамическая активность микрокапсул, загруженных фотосенсибилизатором

Антибактериальная активность микрокапсул, нагруженных фотосенсибилизаторами, против штаммов Staphylococcus aureus ATCC 25923 и Escherichia coli (E.coli) ATCC 25922 определялась с помощью модифицированного метода минимальных ингибирующих концентраций. Эксперимент проводился в трех проворностях для обеспечения его воспроизводимости. Для этого 300 мкл суспензии бактерий смешивали с суспензией микрокапсул в разном соотношении и инкубировали в течение часа, чтобы обеспечить взаимодействие между бактериальными клетками и микрокапсулами. Затем полученные смеси облучали светоизлучающим диодом 680 нм, как описано выше. После облучения лазерным диодом инокулировали 100 мкл бактериальной суспензии на стерильные твердые

поверхности питательного агара (NA) объемом 20 мл в чашках Петри (2R = 7,5 см), после чего, инкубировали в течение 24 ч при 37 °C для получения бактериальных индивидуальных колоний на поверхности твердых сред. Образцы, которые не подвергались облучению, рассматривались как контроль. Результаты были выражены как арифметические средства со стандартными отклонениями. Штаммы S. aureus ATCC 25923 и E.coli ATCC 25922 были любезно предоставлены Саратовским институтом травматологии и ортопедии (Саратов, Россия).

2.18 Характеризация

Для оценки структуры и морфологии полиэлектролиных структур ядрооболочка и микрокапсул (после растворения ядер) а также микрорезервуаров на поверхности подложеку были использованы изображения, полученные методом растровой электронной микроскопии (SEM) в режиме вторичных электронов при 5 кэВ при помощи FE SEM JSM6700F. Образцы готовились путем высушивания капли исследуемой суспензии микрокапсул объемом 10 мкл на кремниевой пластине в течение ночи. Перед измерением SEM поверхность образца покрывали золотом.

Для оценки толщины стенки оболочки микрокапсула проводилась атомносиловая микроскопия (ACM) с помощью зондовой станции спектроскопии NT-MDT Ntegra в полуконтактном режиме с зондами серии GOLDEN NSG10 с обычно радиусом кривизны 6 нм. Образцы готовились путем высушивания суспензии микрокапсул объемом 2 мкл на поверхности покровного стекла.

Концентрации капсул в суспензиях оценивали с помощью гемоцитометра. Для каждой суспензии ячейку заполняли 5 раз и для каждого подсчитывали по меньшей мере 400 капсул.

Оценка эффективности загрузки капсул проводилась с помощью двух взаимодополняющих подходов. В первом подходе, надосадочный раствор собирали после процесса захвата и анализировали методом спектрофлуометрии. Суммарную потерю инкапсулированного вещества вычитали из начальной концентрации и относили к загруженным микрокапсулами. Сравнительная эффективность загрузки термически обработанных микрокапсул рассчитывалась по уравнению (2):

$$E_{comp} = \frac{C[dye]_{heat} - C[dye]_{control}}{C[dye]_{control}}$$
(2)

Где E_{comp} - сравнительная эффективность, $C[dye]_{control}$ контроль концентрация фталоцианинового красителя, инкапсулированного контрольными микрокапсулами и C[dye]_{heat} - тепловая концентрация фталоцианинового красителя, инкапсулированного нагретыми микрокапсулами. Во втором подходе была определена полезная нагрузка. Для этой цели после инкубации образцы центрифугировали заданного времени и собирали надосадочный раствор с выброшенной полезной нагрузкой и анализировали флуоресцентную спектроскопию для оценки количества целевого вещества путем сравнения полученных значений с калибровочными растворами. Каждый калибровочный раствор содержал столько же соли и буфера, либо щелочи в качестве растворов образцов. Надосадочную жидкость заливали свежим раствором фермента или щелочи для оценки дальнейшего высвобождения. Кумулятивное количество высвобожденного вещества объединялось с каждого измерения. Спектроскопические измерения проводились с помощью УФ-спектроскопии (Shimadzu 1600) и флуоресцентной спектроскопии (Tescan).

Конфокальную лазерную сканирующую микроскопию проводили с Leica TCS SP8 X (Leica Microsystems, Германия). Для измерения CLSM, клетки HeLa высевали в чашку Петри и инкубировались в течение 24 часов. Затем в клеточную среду добавляли суспензию микрокапсул, содержащих фотосенсибилизатор, в концентрации 2 капсулы на клетку или раствор фотосенсибилизатора на основе фталоцианина цинка в концентрации, соответствующей 2 капсулам на клетку (с учетом 0,9 пг холосенса, загруженных на капсулу) и инкубировали в течение 2 часов.

Для оценки содержания красителей в растворах, а также для измерения поглощения пленок была проведена спектрофотомерия с использованием Shimadzu установки применением двухлучевого с сканирующего спектрофотометра Lambda-C650 (Perkin Elmer, США). Спектры растворов были получены с использованием одноразовых пластиковых кювет. Для оценки концентрация красителей в надосадочных растворах для измеряемых веществ были построены калибровочные кривые на основе пошлощения раствора на длине волны максимального поглощения измеряемого красителя, при этом в качестве референса была использована деионизованная вода. Количество красителя, иммобилизированного с помощью микрокапсул, оценивалось как по разнице концентрации раствора красителя до и после процесса захвата красителя микрокапсулами (посредством нагрева), так и по концентрации высвобожденного красителя после растворения микрокапсул, нагруженных данным красителем. веществ (ЭК) Эффективность связывания микрокапсулами определяется следующим выражением:

$$\Im K = \frac{K_{\rm d} - K_{\rm cyn}}{K_{\rm d}} \cdot 100\%, \tag{3}$$

где К_д – количество красителя (концентрация) в суспензии микрокапсул до начала иммобилизации, К_{суп} – количество вещества в надосадочном растворе после иммобилизации красителя посредством нагрева. Кроме того, оценивалась относительная эффективность (ОЭК) связывания вещества для термообработанных микроконейнеров, выраженная уравнением (4)

$$O\Im K = \frac{\Im K_t - \Im K_\kappa}{\Im K_\kappa} \cdot 100\%, \tag{4}$$

где ЭК_t – эффективность связывания термообработанной суспензии микроконтейнеров, ЭК_к - эффективность связывания не нагретой (контрольной) суспензии микроконтейнеров. Все приведенные измерения были проведены в четырех повторностях в одинаковых условиях.

Для измерения спектров пленок использовался спектрофотометр, снабженный интегрирующей сферой для устранения влияния рассеяния пленок на полученные данные по оптической плотности материала, а также использовались алюминиевые подложки, отражающие как в видимом, так и в ближнем ИК диапазонах.

ГЛАВА З СИНТЕЗ И СВОЙСТВА КОМПОЗИТОВ, СОДЕРЖАЩИХ КАРБОНАТ КАЛЬЦИЯ

3.1 Биоподобная минерализация полиэлектролитных микроконтейнеров

Синтез функциональных и механически стабильных микроконтейнеров является одной из приоритетных задач в области создания новых систем адресной доставки лекарств. Механически параметры микроконтейнеров влияет на широкий спектр функций микроконтейнеров. Так, процесс интернализации микрокапсул в биологические клетки как in vitro, так и in vivo является комплексным и зависит от способности капсулы деформироваться при прохождении липидной мембраны клетки. И хотя механизм интернализации различных носителей может варьироваться, однако понятно, что механические характеристики микрокапсулы будут регулировать этот процесс. В случае применения массивов микроконтейнеров, упорядоченных на подложках, в качестве лекарственных депо для пролонгированного высвобождения действующих веществ внутри организма также необходима высокая механическая стабильность, так как в организме массив микроконтейнеров будет подвергаться не только биодеградации, но и испытывать значительные механические нагрузки. Таким образом, задача материаловедения по разработке новых материалов, которые способны выполнять ряд функций по доставке лекарств и пролонгированному высвобождению с заданным профилем, актуальной, особенно необходимости соблюдения является с учетом биосовместимости такого материала и отсутствия посторонних токсических эффектов. Перспективным подходом в этом случае представляется применение биоподобных подходов, которые бы копировали природные процессы, что, как ожидается, позволит с высокой эффективность синтезировать материалы с заданными свойствами. Одним из таких подходов является биоминерализация, заключающаяся в последовательной накачке ионов солей в полимерную матрицу,

что приводит к зародышеобразованию и росту неорганической фазы в полимерных материалах.

Обсуждаются результаты экспериментов конструированию ПО композитного материала на основе полиэлектролитов и карбоната кальция и по контролируемому формированию неорганической фазы карбоната кальция в полых полиэлектролитных микроконтейнерах, сформированных мультислойными пленками состава (PSS/PAH)₄₀ и (PSS/PDADMAC)₁₀. Для этого полиэлектролитные микроконтейнеры, полученные по методике, описанной выше, последовательно помещались в одномолярные растворы хлорида кальция и карбоната натрия на 15 пленка насыщается МИНУТ, В результате чего ионами И индуцирует зародышеобразование и рост неорганической фазы карбоната кальция [107].

Для оценки влияния состава полиэлектролитных пленок на свойства образуемых ими контейнеров были использованы две пары полиэлектролитов с различными свойствами, а именно пленки, сформированные слабым и сильным полиэлектролитами и двумя сильными. В качестве сильных полиэлектролитов выбраны PSS и PDADMAC, а в качестве слабого – PAH [108]. Слабые полиэлектролиты сильно зависимы от pH внешней среды, что может оказать влияние на процесс минерализации, так как он подразумевает под собой инфильтрацию насыщенными щелочными растворами. Кроме того, пара PSS/PDADMAC намного более проницаема, чем PSS/PAH [109].

Массивы микроконтейнеров, сформированных полиэлектролитными мультислойными пленками, были получены аналогично процессу, описанному в предыдущей части, с добавлением дополнительного этапа для минерализации плёнки.

Минерализация полиэлектролитных пленок была проведена методом последовательной инфильтрации данной пленки концентрированными растворами солей хлорида кальция CaCl₂ и карбоната натрия Na₂CO₃. После минерализации осуществлялся перенос пленки на противо-подложку, покрытую пленкой (PSS/PDADMAC)₄, как было описано в предыдущей главе.

3.1.1 Морфология пленок на шаблоне

На рисунке 4 показаны СЭМ изображения пленок (PSS/PAH)_n различной толщины в соответствии с количеством полиэлектролитных бислоев в мультислое, синтезированные в двухмолярном растворе хлорида натрия на поверхности шаблона с массивом микролунок. Увеличение толщины соответствует литературном данным о линейном характере возрастания толщины в зависимости от количества слоев в пленке, полученных для плоской поверхности при ионной силе раствора меньше 0,3 М.

Приведенные ниже СЭМ изображения показывают морфологию полиэлектролитных пленок различной толщины на шаблоне с массивом микролунок до и после процесса инфильтрации солями хлорида кальция и карбоната натрия. Как и ожидалось, с ростом числа слоев полиэлектролитов толщина пленки возрастает (рисунок 4). Так же наблюдается изменение диаметра микролунок после инфильтрации, что свидетельствует об изменении толщины пленки. Это явление может быть связано с ростом неорганической фазы карбоната кальция внутри пор мультислоя, а не на поверхности пленки.



Рисунок 4 – Изображения СЭМ шаблонов с массивом микролунок, покрытых пленкой состава PSS-PAH. Верхний ряд показывает контрольные образцы без инфильтрации; нижний ряд – образцы; вымоченные в солях хлорида кальция и карбоната натрия

В сравнении с контрольным образцом пленки после инфильтрации имеют большие образования, находящиеся внутри пленки исходя из морфологии поверхности, однако, искажающие поверхность (рисунок 4). Это указывает на то, что рост неорганической фазы карбоната кальция может проходить под поверхностью пленки, то есть внутри пор полиэлектролитного мультислоя.

3.1.2 Морфология композитных микроконтейнеров

Рисунок 5 показывает СЭМ изображения серии образцов микроконтейнеров композиций (PSS/PAH)₄₀ и (PSS/PDADMAC)₁₀ после 10 и 20 циклов химической инфильтрации. Топография микроконтейнеров, сформированных полиэлектролитной пленкой (PSS/PAH)₄₀, претерпевает значительные изменения. Перед инфильтрацией поверхность пленки обладает низкой шероховатостью, без каких-либо образований. После 10 и 20 циклов инфильтрации поверхностная шероховатость повышается, а также наблюдаются наличие сферических

субмикронных образований на поверхности (рисунок 5 *b*). Искажения в топографии пленки отнесены к зародышеобразованию и росту неорганической фазы карбоната кальция внутри полиэлектролитной пленки. Кроме того, часть микроконтейнеров претерпевают значительные деформации, что вероятно связано с механическими напряжениями в процессе удаления оригинального шаблона (рисунок 5 *c*).



Рисунок 5 – Изображения сканирующей электронной микроскопии показывают изменения в морфологии микроконтейнеров PSS/PAH (*a-d*) и PSS/PDADMAC (*e*-

f) после 10 циклов инфильтрации (*b*, *c*, *f*) и 20 циклов (*d*), (*g*) показывает энергодисперсионный элементарный анализ микроконтейнеров после 20 циклов инфильтрации

Изменения в топографии микроконтейнеров на основе пары сильных полиэлектролитов (PSS/PDADMAC)₁₀ несколько менее выражено, однако, повышение шероховатости и деформация микроконтейнеров так же наблюдаются (рисунок 5). Причинами слабого эффекта в сравнении с парой полиэлектролитов «слабый сильный» могут быть как более сильные связи межли полиэлектролитами, которые более устойчивы к изменению рН внешней среды, так и большая толщина пленки (PSS/PDADMAC)₁₀ в сравнении с (PSS/PAH)₄₀. По

результатам измерения поперечного сечения пленок толщина композиции (PSS/PDADMAC)₁₀ была оценена в $1,9 \pm 0,3$ мкм, в то время как толщина (PSS/PAH)₄₀ составила лишь $0,3 \pm 0,05$ мкм.

3.1.3 Анализ состава микроконтейнеров

Анализ изменений в элементном составе мультислойной пленки был проведен методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭРС), как по поверхности пленки, так и на отдельных микроконтейнерах. Анализ ЭРС показал наличие в образце кальция, углерода и кислорода и значительные их флуктуации по поверхности образца (рисунок 5). Результаты ЭРС показывают, что кальций имеет тенденцию накапливаться в оболочке резервуаров больше, чем на плоских участках пленки.

Массовая доля неорганической фазы, сформированной внутри полиэлектролитной пленки с массивом микроконтейнеров была определена методом термогравиметрического анализа (ТГА). На рисунке 6 а, b показаны профили ТГА для (PSS/PAH)₄₀ и (PSS/PDADMAC)₁₀ микроконтейнеров. До химической инфильтрации, контрольный образец состава (PSS/PDADMAC)₁₀ теряет 9,3% массы по мере нагрева до 350 °C, что связано с испарением связанной воды. Затем в диапазоне от 350 до 550°С теряется 82,3% массы в связи с разрушением органических материалов. После инфильтрации образцов солями появляется дополнительный пик потери массы в диапазоне температур от 550 до 700°С (рисунок 6), который четко проявляется после 10 и больше циклов инфильтрации.



Рисунок 6 - Профили термогравиметрического анализа нанокомпозитных полиэлектролитных микроконтейнеров, сформированных пленками (PSS/ PDADMAC)₁₀ (*a*) и (PSS/PAH)₄₀ (*b*) до проведения инфильтрации (зеленая линия) и после проведения 20 циклов инфильтрации (красная линия). Синяя линия на рисунках (*a*) и (*b*) показывает производную массы для потерь при 20 циклах инфильтрации. Рисунок (*c*) показывает зависимость массовой доли карбоната кальция от числа циклов инфильтрации

Проявление дополнительного пика потери массы связано со сгоранием неорганической фазы карбоната кальция, что соответствует литературным данным:

$$CaCO_3 \rightarrow CaO + CO_2$$

Принимая во внимание молекулярную массу карбоната кальция CaCO₃ и оксида кальция CaO (100,091 и 56,08 г/моль, соответственно) массовая доля карбоната кальция в полимерной матрице может быть вычислено из пика 2 (рисунок 6). ТГА пленки (PSS/PAH)₄₀ имеет аналогичный профиль и приведённые выше рассуждения применимы для нее. На рисунке 6 *с* показана зависимость массовой доли CaCO₃ от количества циклов инфильтрации, вычисленная исходя из пика 2 на ТГА профилях. Эти результаты показывают, что массовая доля карбоната кальция возрастает линейно с увеличением количества циклов инфильтрации.

3.1.4 Моделирование механических деформаций микроконтейнеров под действием внешней нагрузки

Механические свойства полученных композитных микроконтейнеров были исследованы методом наноиндентирования. Для всех измерения были выбраны отдельные микроконтейнеры с неповрежденной оболочкой. Типичные кривые нагрузка-деформация F-є полученные методом наноиндентирования микроконтейнеров композиций (PSS/PAH)₄₀ до и после химической инфильтрации после цикла «повышение нагрузки - постоянная нагрузка - разгрузка» показаны на рисунке 7. Деформация є в данном случае является процентным отношением смещения зонда к высоте микроконтейнера (4 мкм). Предел текучести слабо выражен для всех протестированных образцов, что указывает на отсутствие участка чистой упругой деформации в данной системе.

Согласно результатам наших экспериментов, существует критическое значение модуля Юнга микроконтейнеров, необходимое для сохранения геометрии микроконтейнеров, которое зависит от толщины оболочки и от геометрии микроконтейнера.

Теория упругих оболочек [110] предсказывает существование критического напряжения, выше которого упругая оболочка рушится вследствие потери устойчивости. В данной работе оцениваются механические характеристики микроконтейнеров в области малых деформаций, где не происходить прогиба стенок оболочки, то есть ниже критической нагрузки. Согласно классической теории упругих оболочек следующие уравнения определяют критическое напряжение, $\sigma_{\kappa p}$ и критическую нагрузку, $P_{\kappa p}$ для цилиндрических оболочек [111]:

$$\sigma_{\rm \kappa p} = \frac{Eh}{\alpha\sqrt{3(1-\vartheta^2)}} \tag{5}$$

$$P_{\rm kp} = \sigma_{\rm kp} A = 2\pi a h \sigma_{\rm kp} = \frac{2\pi E h^2}{\sqrt{3(1-\vartheta^2)}} \tag{6}$$

где *E* - модуль Юнга, *θ* - коэффициент Пуассона, *A* – сечение оболочки, *h* - толщина оболочки, *a* - радиус цилиндра. Это выражение верно для цилиндрической оболочки, если:

$$\left(\frac{\pi a}{l}\right)^2 < \frac{2a}{h}\sqrt{3(1-\vartheta^2)} \tag{7}$$

где 1 - длина цилиндра. Геометрия всех шаблонов, используемых в данной работе, удовлетворяет этому условию. Используя эту модель и предполагая, что нагрузка на микроконтейнер обусловлена только ее собственным весом, можно оценить модуль упругости материала микроконтейнера, $E_{\kappa p}$ (когда модуль Юнга Е пленки меньше, чем $E_{\kappa p}$, происходит коллапс микроконтейнера под действием собственного веса):

$$E_{\rm \kappa p} = \frac{a^2 \rho g \sqrt{3(1-\vartheta^2)}}{2h} \tag{8}$$

где ρ - плотность пленки РАН–РSS (~1200 кг·м⁻³) [112], g - ускорение свободного падения (9,81 м·с⁻²). Принимая коэффициент Пуассона 0,5 (коэффициент Пуассона несжимаемого упругого материала), можно получитьрассчитанный критический модуль упругости, $E_{\kappa p}$, в диапазоне 0,2–0,4 Па. Это на порядок меньше модуля упругости мультислойной пленки (РАН–РSS)_n согласно литературным данным [18,19]. Согласно модели гравитационного коллапса, все микроконтейнеры должны быть механически стабильными, что отличается от экспериментальных результатов. Отсюда следует, что гравитация не главная причина коллапса микроконтейнеров. То же самое было показано ранее для других микроструктур [113]. Капиллярные силы и движение растворителя при сушке так же вызывают механическое давление, которое может вызвать деформацию микроконтейнеров и приведение «крышки» контейнера в контакт с подложкой, приводя к коллапсу [114].

Согласно модели, описанной в работе [113] можно предположить, что микроконтейнер будет устойчив, если он может восстановить исходную форму. Необратимое разрушение происходит, если прочность контакта «крышки» микроконтейнера с подложкой превосходит критическое напряжение, которое микроконтейнер может выдержать. Отсюда выражение для критического модуля Юнга может быть переписано следующим образом:

$$E_{\rm \kappa p} = \frac{a^2 \sigma_{ad} \sqrt{3(1-\vartheta^2)}}{2h^2} \tag{9}$$

В данной работе в качестве подложки во всех экспериментах были использованы кремневые пластины. Согласно литературным данным [115] адгезия полиэлектролитной пленки состава PSS/PAH к кремниевым пластинам составляет 6 МПа. Следовательно, величина критического модуля Юнга микроконтейнеров *E_{кp}* находится в диапазоне от 300 до 840 МПа. Эта величина в 5-10 раз ниже, чем было опубликовано ранее для сухих пленок состава PSS/PAH (4-6 Гпа) [19], однако, попадает в диапазон модуля Юнга влажных пленок состава PSS/PAH (100 – 750 МПа). Отсюда следует, что микроконтейнеры, полученные с помощью выбранных шаблонов должны сохранять свою геометрическую форму после удаления шаблона, если они сделаны из мультислойной пленки, толщина которой обеспечивает модуль Юнга выше критического.

Можно предположить, что движущей силой коллапса микроконтейнеров является адгезия их «крышек» к кремниевой подложке (рисунок 5) (изображения, полученные методом СЭМ позволяют подтвердить это предположение); коллапс происходит после растворения шаблона РММА, пока полиэлектролитные оболочки микроконтейнеров еще влажные.

Микроконтейнеры, сделанные из полиэлектролитной пленки толще, чем некоторой критической величины выдерживает растворение шаблона, и дальнейшая сушка делает эти контейнеры еще прочнее.

Способность микроконтейнеров выдерживать механические нагрузки имеет решающее значение для их применения в качестве резервуаров для хранения веществ.

Механические свойства индивидуальных микроконтейнеров были исследованы с помощью наноиндентора с алмазным зондом Берковича при различных скоростях нагрузки.

Согласно теории упругости линейная кривая $F(\mathcal{E}^{1/2})$ характерна для сжатия эластичных оболочек с уменьшением объема оболочки без растяжения оболочки (в отличии от сжатия эластичных мембран, которые растягиваются без изменения объема), в приближении цилиндрической оболочки может быть записано следующее уравнение [116]:

$$F = \frac{1.8Eh^{5/2}}{R^{1/2}(1-\vartheta^2)^{3/4}} \varepsilon^{1/2} = b \varepsilon^{1/2}$$
(10)

где R - радиус оболочки, а h - толщина оболочки. Энергия упругой деформации здесь в основном затрачивается на изгиб оболочки, который сконцентрирован в узкой области вокруг центра приложения силы, называемой линией изгиба. Стоит отметить, что такая деформация не обязательно обратима. Можно предположить, что деформация полиэлектролитных микроконтейнеров следует тому же закону. Такой режим может быть выполнен в том случае, если воздух легко удаляется из микроконтейнера. Ранее деформация такого же типа была показана для полых полиэлектролитных микрокапсул [117].

Оценив наклон усредненной кривой линейного участка (рисунок 7 *a*, *b*) и приняв толщину оболочки h = 370 нм, коэффициент Пуассона описываемой мультислойной пленки PSS/PAH $\vartheta = 0,33$, радиус *R* микрокамеры соответствующий используемому шаблону, график зависимости модуля Юнга, рассчитанный по формуле 6 представлен на Рисунке 7 *c*.



Рисунок 7 – Кривые нагрузка-деформация, полученные методом индентирования отдельных микроконтейнеров, сформированных пленками состава (PSS/PDADMAC)₁₀(*a*) и (PSS/PAH)₄₀(*b*); значения модуля Юнга микроконтейнеров в зависимости от массовой доли карбоната кальция в

композите (с)

Полученный диапазон значений хорошо согласуется с литературными данными, полученными для планарных пленок состава PSS/PAH. Соответствующие изображения, полученные методом СЭМ, микроконтейнеров после наноиндентирования с различными скоростями нагрузки представлены на рисунке 8. С низкими скоростями нагрузки (менее 0,07 мH/с) зонд не оставляет следов на микроконтейнеры. При более высокой скорости загрузки зонд начинает образовывать треугольное отверстие в крышке микроконтейнеров, при этом, чем выше скорость, тем больше отверстие в контейнере, указывающее на большую глубину проникновения зонда.

62



Рисунок 8 – СЭМ изображения после индентирования острым зондом на скорости 0,33 мH/c: (*a*) контрольный образец композиции PSS/PAH; (*b*) PSS/PSH после 10 циклов инфильтрации; (*c*) PSS/PDADMAC контрольный образец; (*d*) PSS/PDADMAC после 10 циклов инфильтрации

Юнга был посчитан при низких деформациях (1%), где Модуль предполагается большой вклад упругой деформации. При одинаковой приложенной нагрузке деформация композитных микроконтейнеров после минерализации значительно ниже, чистых полиэлектролитных чем для микроконтейнеров, что указывает на повышение модуля Юнга нанокомпозитной пленки.

На рисунке 7 *а-с* показаны зависимости деформации индивидуальных микроконтейнеров от приложенной силы и модуль Юнга микроконтейнеров как функция массовой доли карбоната кальция в полиэлектролитной пленке.

Наибольшее увеличение модуля Юнга композитной пленки в сравнении с чистой полиэлектролитной составило 3,3 раза для пленок состава (PSS/PAH)₄₀ и 2,9 для состава (PSS/PDADMAC)₁₀ и наблюдалось в обоих случая после 10 циклов инфильтрации с последующим снижением механических свойств при большем количестве циклов инфильтрации.

В случае (PSS/PAH)₄₀ микроконтейнеров после наноиндентирования наблюдается прогиб стенок, что показано с помощью СЭМ изображений (рисунок 8 *a*, *b*), однако микроконтейнеры композиции (PDADMAC/PSS)₁₀ реагируют иначе (рисунок 8 *c*, *d*), что связано с большей толщиной стенок (около 2 мкм) соизмеримых с радиусом микроконтейнера. Такая композиция препятствуют прогибу стенок, что подтверждается СЭМ изображениями, которые показывают, что зонд наноиндентера склонен проминать пленку без прогиба стенок.

После 20 и 40 циклов инфильтрации наблюдается значительное снижение модуля Юнга микроконтейнеров (рисунок 7 *c*), при этом содержание карбоната кальция в структуре продолжает линейно возрастать. Это может быть объяснено нарушением структуры полимерной матрицы, и, таким образом, нарушаются свойства композита, так как полимерная матрица в композите выполняет свойства связывающего материала. Схожий эффект наблюдался ранее в работе [118].

Отличия между композициями, образованными парами полиэлектролитов PAH/PSS и PDADMAC/PSS после минерализации могут заключаться в различной пористости, подвижности цепей и толщине пленки.

На втором этапе работы циклы минерализации были проведены после переноса микроконтейнеров на противо-подложку. После 10 циклов минерализации наблюдалось формирование частиц карбоната кальций вокруг оболочки микроконтейнеров без значительных морфологических изменений пленки вокруг (рисунок 9). Причина отличия может заключаться в наличии пузырька воздуха (подтверждено спектроскопией комбинационного рассеяния), что препятствует диффузии ионов солей через пленку и приводит к росту частиц на поверхности.



Рисунок 9 – СЭМ изображение микроконтейнера после инфильтрации солями карбоната натрия и хлорида кальция

Энергодисперсионный анализ показал 60% содержания кальция в образованиях, что соответствует карбонату кальция, однако, в этом случае не формируется композитная структура, а наблюдается рост неорганической фазы на неоднородностях полиэлектролитной пленки.

3.2 Выводы

Сконструированы высокоупорядоченные массивы микроконтейнеров, образованные композитной полиэлектролитной пленкой при помощи методов полиионной сборкой и биоподобного подхода минерализации.

Показана возможность зародышеобразования и роста неорганической фазы карбоната кальция в полиэлектролитной пленке с массивом микроконтейнеров,

сформированных мультислоями (PSS/PAH)₄₀ и (PSS/PDADMAC)₁₀ в результате последовательной инфильтрации концентрированными растворами солей.

Присутствие неорганической фазы карбоната кальция в полиэлектролитной пленке продемонмтрировано методами ТГА и ЭРС, показано, что кальций карбонат имеет тенденцию накапливаться в микроконтейнерах больше, чем в плоских участках пленки.

Массовая доля карбоната кальция в полиэлектролитной пленки с массивом микроконтейнеров возрастает линейно с количеством циклов инфильтрации в ходе минерализации.

Анализ СЭМ изображений показал морфологические изменения полиэлектролитной пленки и микроконтейнеров, что указывает на структурные изменения пленки.

Показано, что модуль Юнга микроконтейнеров возрастает в 2,9 и в 3,3 раза для (PSS/PDADMAC)₁₀ и (PSS/PAH)₄₀ композиций, соответственно, после 10 циклов инфильтрации, что соответствует массовой доле CaCO₃ в 15% и падает при дальнейшем увеличении массовой фракции карбоната кальция.

Таким образом, существует оптимальное значение содержания карбоната кальция в полиэлектролитной пленке, приводящее к максимальному модулю Юнга микроконтейнеров, сформированных ими. На основе полученных данных была опубликована статья [107].

ГЛАВА 4 КОМПОЗИТНЫЕ ПЛЕНКИ И МИКРОКОНТЕЙНЕРЫ, СОДЕРЖАЩИЕ УГЛЕРОДНЫЕ НАПОЛНИТЕЛИ

4.1 Микроконтейнеры на основе полиэлектролитов и оксида графена

Рассматриваются формирования процессы нанокомпозитных полиэлектролитных пленок, содержащих в качестве наполнителя оксид графена, методом полионной сборки на шаблонах с массивом микролунок, что накладывает дополнительные ограничения на условия формирования пленки. Использование шаблона в качестве подложки для полиионной сборки позволяет далее сформировать массивы микроконтейнеров. Включение оксида графена в нанокомпозитные материалы было многократно отмечено эффективным способом повышения не только механических характеристик материала, но и также его оптических характеристик, что может быть использовано для повышения стабильности микрорезервуаров, а также, одновременно с этим, для повышения их оптического поглощения в видимой и ИК области и, как следствие, для повышения их чувствительности к действию лазерного излучения, выраженного в деградации целостности их оболочек с последующим высвобождением иммобилизированного вещества. Использование ближнего ИК диапазона в диапазонах длин волн 700-800 нм и свыше 1000 нм является крайне востребованным в биомедицинских приложениях, благодаря высокой прозрачности биологических тканей в данной области длин волн.

4.1.1 Морфология и структура ПЭМ и ПЭОГМ пленок на поверхности ПММА шаблонов

Схема процесса получения полых микрокамер с использованием ПММА шаблонов показана на рисунке 10. Полиионная сборка мультислоя состава

PSS/PAH происходит за счет электростатических взаимодействий, а также за счет повышения энтропии, что обусловлено высвобождением молекул растворителя и противо-ионов, по мере адсорбции молекул полиэлектролитов.



Рисунок 10 – Схема получения полых микроконтейнеров на подложке: (*a*) с использованием растворяемого шаблона ПММА; (*b*) с использованием обратимого шаблона ПДМС

Составы для производства композитных пленок были выбраны исходя из соображений обеспечения эффективного переноса нагрузки на границе контакта оксид графена – полимер, что обеспечивается при наличии толстого слоя полимерной матрицы между слоями оксида графена [119].

На рисунке 11 показаны СЭМ изображения поверхности ПММА шаблона до мультислойными пленками $(PSS/PAH)_{42}$ И после покрытия И ((PSS/PAH)₁₂/OГ/PAH)₃. Пленка (PSS/PAH)₄₂ повторяет топографию шаблона с обладает высокой точностью И относительно высокой поверхностной шероховатостью по сравнению с чистым ПММА, что ожидаемо для пленок, сформированных при высокой ионной силе в 2 М [120]. Толщина пленки составляет 0.57 ± 0.01 мкм в верхней части шаблона и только 0.33 ± 0.01 мкм в глубине лунки, что было оценено по разнице размера лунки чистого шаблона ПММА и шаблона, покрытого плёнкой. Причиной понижения толщины пленки в лунке может быть затрудненная диффузия полимерных цепей из раствора в лунки во время полиионной сборки [121].



Рисунок 11 – Изображения СЭМ шаблона ПММА до (*a*) и после полиионной сборки мультислойных пленок композиций (PSS/PAH)₄₂ (*b*); ((PSS/PAH)₂₀/OГ/PAH)₂ (*c*); ((PSS/PAH)₁₂/OГ/PAH)₃ (*d*) и (PSS/PAH)₅/OГ/PAH)₇ (*e*)

Мультислойная полиэлектролитная пленка состава ((PSS/PAH)₁₂/OГ/PAH)₃ характеризуется повышенной толщиной и сниженной шероховатостью поверхности по сравнению с пленками, не содержащими оксид графена, состава

 $(PSS/PAH)_{42}$, что может быть объяснено отсутствием глобулярных структур полиэлектролитов. Однородность пленки $((PSS/PAH)_{12}/O\Gamma/PAH)_3$ по площади образца значительно ниже, чем в чистой полиэлектролитной пленке. Причиной неоднородности может служить вариативность в том, как лист оксида графена ляжет на поверхность с массивом лунок. Кроме того, вклад в неоднородность композитной мультислойной пленки вносит разброс по размерам и количеству слоев в листе оксида графена. Отмечено, что листы оксида графена имеют тенденцию сглаживать углы квадратных лунок шаблона и даже полностью закрывать некоторые из них, что обусловлено значительным размером листов $D_{90} = 1.9$ мкм (рисунок 12).



Рисунок 12 – Изображение СЭМ листа оксида графена

Толщина композитной пленки с тремя слоями оксида графена составляет $2,6 \pm 0,5$ мкм на поверхности шаблона. Топография пленки, однако, исключает возможность измерить толщину пленки в лунке по полученным изображениям. Стоит отметить, что пленка, включающая два слоя оксида графена ((PSS/PAH)₁₂/OГ/PAH)₂, обладает намного меньшей толщиной в диапазоне 0,08 - 0,33 мкм.

Склеивание полученных мультислойных пленок на поверхности ПММА шаблона с противо-подложкой с последующим растворением ПММА обнажает внутреннюю сторону пленки, как показано на рисунке 13. Внутренняя часть пленки обладает значительно более низкой шероховатостью поверхности, чем внешняя сторона. Однако, процент микроконтейнеров, сохраняющих форму оригинального шаблона значительно выше для мультислойных пленок состава полиэлектролитоксид графена (ПЭОГМ), чем для ПЭМ пленок: 91% и 55% соответственно, тогда как остальная часть микроконтейнеров разрушена. Это указывает на усиление механических свойств мультислойной пленки, содержащей оксид графена. СЭМ изображения поперечного сечения образцов показывают, что обе композиции ПЭОГМ и ПЭМ обеспечивают полую структуру микроконтейнеров (рисунок 13 *с*, *d*).


Рисунок 13 – Изображения СЭМ массива микроконтейнеров после переноса на противо-подложку и растворения ПММА шаблона следующих композиций: *(a, c)* - (PSS/PAH)₄₂; *(b, d, e)* - ((PSS/PAH)12/OГ/PAH)₃

Изображения поперечного сечения так же были использованы для оценки толщины крышки микроконтейнеров: в случае мультислойной пленки (PSS/PAH)₄₂ значение толщины составило $0,37 \pm 0,09$ мкм и несколько меньшее значение для композиции ((PSS/PAH)₁₂/OГ/PAH)₃ $0,25 \pm 0,03$ мкм. Очевидно, толщина пленки в 2,6 мкм для ПЭОГМ пленки на рисунке 13 преимущественно сформирована на поверхности ПММА шаблона, в то время как пленка, сформированная внутри лунок, значительно ниже. Снижение толщины стенок ПЭОГМ микроконтейнеров

может быть объяснено пониженной диффузией компонентов внутрь лунок, так как листы оксида графена имеют тенденцию уменьшать наружный диаметр лунок (рисунок 13), в то время как время нанесения слоев в процессе полиионной сборки оставалось одинаковым на всех этапах формирования пленки. Более длительная экспозиция шаблона в растворах полиэлектролитов могла бы уровнять пониженную диффузию и обеспечить более высокую толщину ПЭОГМ микроконтейнеров.

Так как оксид графена содержит sp²-гибридизованные атомы углерода в ароматической цепи, может наблюдаться флуоресценция в широком диапазоне длин волн от ультрафиолета до ближнего инфракрасного [122]. В связи с этим ПЭОГМ микроконтейнеры были проанализированы при помощи конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ), соответствующие изображения показаны на рисунке 14.



Рисунок 14 – Изображения КЛСМ микроконтейнеров состава ПЭОГМ (возбуждение 514 нм, эмиссия снята в диапазоне 550-650 нм)

Данные изображение дают представление о распределение листов оксида графена в мультислойной оболочке микроконтейнеров. Метод комбинационного рассеяния подтвердил содержание оксида графина в композитной пленке (рисунок 15).



Рисунок 15 – Спектр комбинационного рассеяния композитной пленки, содержащий 3 слоя оксида графена

4.1.2 Моделирование механических деформаций ПЭМ и ПЭОГМ микроконтейнеров

На основе выкладок, сделанных в главе 3.1.4, и данных полученных методом наноиндентирования были исследованы предел прочности и модуль Юнга нанокомпозитных микроконтейнеров различного состава, включающих в свой состав слои оксида графена. Для всех измерения были выбраны отдельные микроконтейнеры с неповрежденной оболочкой.

Типичные кривые нагрузка-деформация F-ε полученные методом наноиндентирования индивидуальных микроконтейнеров контрольных полиэлектролитных микроконтейнеров $(PSS/PAH)_{42}$ И микроконтейнеров образованных композитной оболочкой «полиэлектролит – оксид графена» ((PSS/PAH)₁₂/OГ/PAH)₃ после цикла повышение нагрузки-постоянная нагрузкаразгрузка показаны на рисунке 16 а. В каждой кривой могут быть выделены два режима: в первом режиме (деформация ниже 16%) данные хорошо совпадают с прямой линией в координатах $F(\mathcal{E}^{1/2})$ (рисунок 16 *b*). Деформация є в данном случае

является процентным отношением смещения зонда к высоте микрорезервуара (10 мкм). Когда нагрузка зафиксирована на значении 1 мН наблюдается ползучесть обоих исследуемых материалов ПЭМ и ПЭОГМ микроконтейнеров (рисунок 16 *a*, *b*). Это указывает на преобладание свойств релаксации полимерной матрицы в обоих случаях.



Рисунок 16 – Кривые зависимости приложенной силы от деформации, полученные методом наноиндентирования микроконтейнеров составов (PSS/PAH)₄₂ (1), ((PSS/PAH)₁₉/OГ/PAH)₂ (2), ((PSS/PAH)₁₂/OГ/PAH)₃ (3) и ((PSS/PAH)₆/OГ/PAH)₆ (4) на скорости приложения нагрузки 0,07 мH/с (*a*); те же кривые в координатах (F- $\varepsilon^{1/2}$) в области малых деформаций и соответствующая линейная аппроксимация (*b*), а так же значения модуля Юнга микроконтейнеров при различных деформациях (*c*). Рисунки (*d*, *e*, *f*) показывают изображения, полученные методом СЭМ, микроконтейнеров после наноиндентирования при скоростях нагрузки 0,07 мH/с, 0,66 мH/с и 1,33 мH/с, соответственно

При низких деформациях ($\mathcal{E} < ~12\%$) микроконтейнеры претерпевают упругую деформацию с последующим прогибом стенок и пластической деформацией. Предел прочности ПЭМ и ПЭОГМ микроконтейнеров был оценен в 3,1 ± 0,3 МПа и 8,6 ± 0,35 МПа соответственно, что соответствует увеличению

композитной структуры по сравнению с чистой полиэлектролитной пленкой в 2,78 раза.

Более того, при одинаковых приложенных нагрузках, деформация ПЭОГМ микроконтейнеров заметно ниже по сравнению с ПЭМ микроконтейнерами, что указывает на возрастание модуля Юнга Е в случае композитной пленки. Количественно модуль Юнга может быть посчитал следующим соотношением:

$$E = \frac{F}{\varepsilon S} \tag{10}$$

где S – площадь контакта зонда наноиндентера с крышкой микроконтейнеров. Рисунок 17 показывает значения модуля Юнга как функцию деформации микроконтейнеров. Наибольшее возрастание модуля Юнга ПЭОГМ микроконтейнеров по сравнению с ПЭМ композицией составило увеличение в 5,6 раза и наблюдается в области упругой деформации (до ~12%).



Рисунок 17 – Зависимость модуля Юнга микроконтейнеров от количества слоев оксида графена в композитной пленке оболочки

При больших деформациях происходит потеря устойчивости стенок и их прогиб, что подтверждается СЭМ изображениями микроконтейнеров после их индентирования. Прогиб стенок приводит к сокращению модуля Юнга ПЭОГМ микроконтейнеров. При деформациях 50% и выше (достигаемых при скоростях нагрузки выше 3 мH/с) происходит прокалывание оболочки микроконтейнеров зонд индентора, как показано на рисунке 17, что приводит к дальнейшему возрастанию модуля юнга для обеих композиций ПЭОГМ и ПЭМ.

В ПЭОГМ пленках количество взаимосвязей между полиэлектролитами и оксидом графена максимально, что обусловлено методом получения пленок, и это ограничивает подвижность полимерных цепей в пленке. С одной стороны, это обеспечивает эффективный перенос давления на границе раздела оксида графена и полимерной матрицы. С другой стороны, относительно слабые силы Ван-Дер-Ваальса между слоями графена в листе приводят к подвижности отдельных слоев, что снижает эффективность переноса нагрузки и, следовательно, результирующий модуль Юнга композита. В работе [123] показано, что листы оксида графена, состоящие из 3 и более слоев, проявляют модуль юнга на порядок ниже. Поскольку в данной работе был использован мультислойный оксид графена – это оставляет перспективу для дальнейшего повышения механических свойств ПЭОГМ микроконтейнеров.

Синтез нанокомпозитных микроконтейнеров на основе полимерной матрицы и углеродных наполнителей, включая такие как оксид графен, приобретает огромное значение не только благодаря высочайшей для подобных микроконейнерам полых структур, но и благодаря возможности сенсибилизации модифицированного объекта к оптическому излучению в видимом и ближнем ИК диапазонах, особенно учитывая тренд современной науке к попытке разработать материалы чувсвительные к свету не только в первом биологическом окне прозрачности (700-800 нм), но и во втором (более 1000 нм), где вариативность в высокопоглощающих материалах значительно снижается. Однако углеродные материалы, в том числе оксид графена обладают высоким поглощением в данной

78

области, что позволит осуществлять как детектирование таких объектов в организме, так и высвобождение из них иммобилизированных веществ.

4.1.3 Выводы

Таким образом, ПЭОГМ микроконтейнеры были успешно сконструированы и синтезированы с помощью полиионной сборки с использованием уничтожаемого ПММА шаблона.

Обнаружено, что ПЭОГМ пленки, сформированные на ПММА шаблоне с массивом микролунок, проявляют скачкообразное изменение свойств при добавлении 3-го слоя оксида графена. Анализ методом наноиндентирования показал значительное усиление механические свойств микроконтейнеров на основе композитной пленки: предел прочности увеличен в 2,78 раза, и модуль Юнга увеличен в 5,6 раза в области упругой деформации, по сравнению с чистой полиэлектролитной пленкой. Это позволило повысить эффективность формирования микроконтейнеров с 55 до 91% (где эффективность определяется как отношение микроконтейнеров, сохранивших геометрию оригинального шаблона), несмотря на несколько пониженную толщину стенок ПЭОГМ микроконтейнеров по сравнению с ПЭМ. Результаты данной главы были опубликованы в работах [124,125].

Результаты показывают возможность создания композита и повышения одновременно механических и оптических характеристик пленки путем варьирования наличия и содержания оксида графена в структуре пленки.

4.2 Синтез и свойства композитов на основе полиэлектролитов и углеродных наноструктур

Обсуждается влияние термической обработки полиэлектролитных пленок и микроконтейнеров на их основе на спектры флуоресценции в зависимости от полимерного состава.

Для решения поставленной цели методом последовательной адсорбции были полиэлектролитных микроконтейнеров сформированы различных массивы составов: (PSS/PAH)₄₀; (PSS/PAH)₄₀, дополнительно выдержанные в растворе декстрана сульфата с концентраций 0,3 мг/мл и 4 мг/мл; (DS/PAH)₄₀. Все приведенные структуры подвергали термической обработке при температуре 180°С согласно описанным в В течение трех часов, литературе методикам гидротермального синтеза углеродных наноструктур. Поскольку термическая обработка проводилась в герметичных условиях, во время процесса не должно происходить сильное окисление. Отжиг проводился в сухом состоянии, что предотвращало движение полиэлектролитных цепей в пленке.

Мультислойные пленки, полученные методом полиионной сборки, были охарактеризованы методом сканирующей электронной микроскопией до и после карбонизации. СЭМ изображения поперечного сечения образцов представлено на рисунке 18. Как видно из сравнения верхнего и нижнего рядов, соответствующих контрольному и обработанному образцам (рисунок 18), изменение толщины пленки после обработки не превышает 10% для всех исследованных мультислойных пленок. Стоит отметить, что отжиг не приводит к сглаживанию поверхности, как это может происходить с чистыми полиэлектролитными многослойными.



Рисунок 18 – Поперечное сечение полученных мультислойных пленок до (*a1, b1, c1*) и после (*a2, b2, c2*) термической обработки при 180°С. Вставки показывают соответствующие АСМ изображения поверхности полученных образцов

Чтобы оценить процессы во время карбонизации В исследованных мультислойных пленках, оценивались с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния света. Обнаружено, что термическая обработка содержащих DS, полиэлектролитных пленок, приводит к значительным изменениям спектра комбинационного рассеяния (рисунок 19 а-с).



Рисунок 19 – Спектры комбинационного рассеяния ПЭМ пленок до (a) и после (b, c) термической обработки и соответствующие карты, сделанные после 180°С (d) и 400°С (e)

Усредненные спектры комбинационного рассеяния с карт образцов до и после термической обработки в разных температурных режимах показаны на рисунке 19 *a-c*. Контрольный образец показывает отчетливый пик при длине волны 1128 см⁻¹, соответствующий связям C=S и S-O либо C-O в полимерных цепях (рисунок 19 *a*). Кроме того, в спектрах контрольного образца наблюдаются два пика при 1600 и 1464 см⁻¹ с коэффициентом интенсивности I_{1600}/I_{1128} 0,856. Пики на длинах волн 1600 и 1464 см⁻¹ связаны с алифатическими цепями и C=C связями. При термической обработке полиэлектролитной пленки при 180°C пик на длине волны 1128 см⁻¹ имеет тенденцию к уменьшению, что указывает на нарушение

полимерных связей с новым коэффициентом интенсивности I_{1600}/I_{1128} 1,663 (рисунок 19 *b*). Более того, D- и G-связи (1360 и 1588 см⁻¹ соответственно) наблюдаются только в отдельных точках на картах спектров комбинационного рассеяния (рисунок 19 *d*, яркие точки) термически обработанного образца проявляются не явно в усредненном спектре (рисунок 19 *b*), а при обработке при 400 °C на всей поверхности образцов присутствуют два пика углерода с четкими D- и G-пиками при 1360 см⁻¹ (рисунок 19 *c*, *e*).

Таким образом, спектры комбинационного рассеяния показывают повышение доли углеродных связей по мере разрушения полимерных связей, что приводит к формированию кристаллоподобных образований за счет ван-дерваальсовых сил, что, означает переход от молекулярно-подобной структуры к «расширенным атомам углерода» с ароматическими кольцами в составе структуры. Потеря полимерными цепями функциональных групп также приводит к упрощенной переориентации молекул и формированию кристаллитов. Ширина Gпика и наличие D-пика позволяют предположить, что эти структуры не упорядочены и содержат большое количество дефектов (рисунок 19 *a-c*).

Изображения КЛСМ показывают зернистую структуру полученных пленок и возрастание равномерности и интенсивности флуоресценции с увеличением количества слоев полиэлектролита (рисунок 20, 21).



Рисунок 20 – Изображения КЛСМ поверхности пленок различной толщины при термообработке: (*a*) - 20 слоев; (*b*) - 40 слоев; (*c*) - 80 слоев; (*d*) – 140 слоев



Рисунок 21 – Изображения сканирующей лазерной конфокальной микроскопии массива микроконтейнеров состава (PSS/PAH)₄₀ (возбуждение 405 нм, флуоресценция 450-550) до термической обработки (*a*), и после термической обработки при температуре 180°С (*b*), а также контейнеров состава (PSS/PAH)₄₀, дополнительно выдержанных в растворе сульфата декстрана 0,3 мг/мл (*c*) и 4

мг/мл (d) после термической обработки при температуре 180°С

Соответствующие спектры флуоресценции многослойных пленок, полученных на разных длинах волн возбуждения, представлены на рисунке 22. По меньшей мере, два отдельных пика могут наблюдаться для термически обработанного образца при 415 и 450 нм, тогда как контрольный образец имеет один пик на более коротких длинах волн. Дискретность спектров флуоресценции автоклавных образцов указывает на существование по меньшей мере двух типов центров люминесценции (люминофоров) в структуре пленки.



Рисунок 22 – Спектры флуоресценции многослойных полиэлектолитных пленок после термической обработки при 180°С, полученные при разных длинах волн возбуждения (*a*), и зависимость интенсивности флуоресценции в зависимости от количества бислоев (*b*)

Показано, что отжиг полученных полимерных пленок приводит к появлению флуоресценции в зелёной области спектра (рисунок 20-22), при этом наличие источника углерода в виде сульфата декстрана в пленке и увеличение его содержания флуоресценция проявляется более интенсивно и равномерно по Результаты площади образца. спектроскопии комбинационного рассеяния образцов свидетельствуют, что при наличии декстрана сульфата флуоресценция обусловлена образованием полиэлектролитной В пленке наноразмерных углеродных структур, которые преимущественно формируются в оболочке контейнеров в ходе отжига. С другой стороны, для пленок состава (PSS/PAH)₄₀ пиков, отвечающих за углеродные структуры, не обнаружено, что свидетельствует о том, что в данном случае флуоресценция обусловлена содержанием гетероатомов в образующихся углеродных структурах.

На рисунке 23 приведены вольтамперные характеристики (BAX) пленок разной толщины при термической обработке. Согласно этим измерениям, отжиг приводит к значительному увеличению проводимости образцов пленок толщиной

40 и 80 бислоев до 10² больше, чем для контрольного образца, в то время как образцы пленок толщиной 20 и 140 бислоев проявляют относительно низкое увеличение проводимости, примерно в 5 раз выше, чем в контрольной выборке.



Рисунок 23 – Вольтамперные характеристики пленок различной толщины при термической обработке: (*a*) - 20 бислоев; (*b*) - 40 бислоев; (*c*) – 80 бислоев; (*d*) – 120 бислоев

Детальный анализ этих кривых показал, что перенос заряда, в основном управляемый процессом пространственно-ограниченного заряда с ограниченной пропускной способностью. Углеродные структуры, распределенные по пленке, играют роль центров, способных захватывать носители заряда, поскольку они имеют уровни энергии в запрещенной зоне полиэлектролитной матрицы. Это приводит к ограничению тока пространственным зарядом (ТОПЗ) в области 1 на рисунке 23. Область 1 соответствует интенсивному захвату зарядов углеродными центрами. Область 3 характеризуется полностью занятыми углеродными центрами, и все введенные носители заряда должны вносить свой вклад в проводимость. ВАХи не вполне соответствуют классическим для ТОПЗ, поскольку углеродные структуры, вероятно, являются аморфными, а структура энергетических зон вряд ли может быть описана.

Стоит отметить, что области с отрицательной дифференциальной проводимостью могут указывать на процесс рекомбинации и, следовательно, на существование двух типов носителей заряда (дырок и электронов).

Падение критического напряжения свидетельствует об увеличении количества центров захвата и уменьшении расстояния между ними. Проводимость термической обработки образцов полученных после близка к области полупроводников. Интересно, что увеличение флуоресценции образцов коррелирует с увеличением проводимости, что указывает на общую причину явлений. Полученные данные открывают широкие возможности для придания системам доставки, как суспензиям капсул, так и лекарственным депо, флуоресценции, обусловленной биосовместимым флуорофором, получаемым из дешевых прекурсоров в результате простой процедуры синтеза. Флуоресценция полученных микроконтейнеров может быть использована не только для контроля состояния микроконтейнеров и оценки степени их деградации или накопления в определенных участках организма, но и для анализа среды вокруг них, так как, вероятно, спектр углеродных наноструктур будет зависеть от окружающей среды. Такой эффект позволит повысить функциональность системы доставки на основе подхода тераностики. Более того, высокая проводимость полученных в пленке углеродных наноструктур потенциально может придать новые функции полученным микроконтейнерам. Но основе опыта применения других проводящих наноструктур (таких как углеродные нанотрубки и золотые наночастицы) для термической абляции раковых опухолей посредством электромагнигого поля радиочастотного диапазона, можно предположить, что полученные углеродные наноструктуры также позволят сенсибилизировать микроконейнеры к действию электромагнитных полей. Результаты данной главы были опубликованы в работах [126–128].

ГЛАВА 5 УПРАВЛЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ МИКРОКОНТЕЙНЕРОВ ПРИ ПОМОЩИ ВНЕШНИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

5.1 Действие ИК излучения на микроконтейнеры на основе полиэлектролитов и оксида графена

Для практических приложений, особенно в задачах биомедицины, является принципиально важным обеспечить чувствительность композитной пленки к излучению в ближней ИК области. ИК диапазон электромагнитного излучения характеризуется наличием так называемых биологических окон прозрачности, то есть диапазоны длин волн, в которые биологические ткани поглощают наименьшее количество энергии излучения и, таким образом, являются прозрачными. Первое окно прозрачности находится в диапазоне длин волн 700-800 нм, однако является наименее прозрачным. Второе окно прозрачности находится на длинах волн более 1000 нм и поглощает значительно меньшее количество энергии волны. Однако количество материалов, способных интенсивно поглощать на длинах волн более 1000 нм крайне ограничено. Материалы, основанные на углероде, особенно углеродные нанотрубки и графен являются одними из тех материалов, которые интенсивно поглощают свет во втором окне биологической прозрачности. В связи с этим нанокомпозитные полиэлектролитные пленки с включением оксида графена являются перспективным материалом с точки зрения удаленного высвобождения инкапсулированного вещества внутри организма посредством лазерного излучения.

В данной главе показано, что ПЭОГМ пленки обладают высоким поглощением в широком диапазоне длин волн до 1500 нм. При длине волны $\lambda = 800$ нм оптическая плотность пленки ((PSS/PAH)₁₂/OГ/PAH)₃ составляет D = 0,14 и постепенно сокращается до D = 0,06 с увеличением длины волны до $\lambda = 1500$ нм (рисунок 24).



Рисунок 24 – Спектр поглощения полиэлектролитной композитной пленки, содержащей 3 слоя оксида графена

Достигнутые значения оптической плотности композитного материала позволяют обеспечить возможность удаленного вскрытия микроконтейнеров на его основе. Для демонстрации возможности удаленного вскрытия ПЭОГМ микроконтейнеров ближним ИК светом, образцы с массивом микроконтейнеров на тонком (0,2 мм) стекле были облучены двумя лазерами с диаметрами пятен 3 мкм (длина волны 800 нм, мощность 3 мВт), а также с диаметром пятна 200 мкм на длинах волн $\lambda = 800, 1000, 1200$ и 1500 нм. На длине волны 800 нм ПЭОГМ микроконтейнеры полностью сгорают, что подтверждается изображениями СЭМ (рисунок 25), в то время как на длине волны 1000 нм сгорают лишь отельные участки диаметром 30-50 мкм (рисунок 25).



Рисунок 25 – Микроконтейнер после облучения пучком лазера на длине волны 800 нм (мощность лазера 3 мВт, диаметр пучка 3 мкм)

При облучении лазером на длине волны 1200 нм наблюдается разрушение только отдельных микроконтейнеров. Разрушений при облучении лазером на длине волны 1500 нм обнаружено не было. С возрастанием длины волны в диапазоне 800 – 1500 нм падает как поглощение ПЭОГМ пленки, так и мощность лазера (с 100 мВт при длине волны 800 нм до 20 мВт при 1500 нм), что приводит к снижению чувствительности ПЭОГМ пленки к излучению лазера. Вскрытие отдельных островков и даже отдельных случайных микроконтейнеров в массиве после облучения их лазером длины волны 1000 и 1200 нм может быть объяснено вариативностью в количестве оксида графена в различных участках пленки.

Таким образом, было показано, что ИК лазер на длине волны 800 нм полностью сжигает ПЭОГМ микроконтейнеры в зоне пятна лазера, в то время как на длинах волн 1000 и 1200 нм осуществляет более мягкое вскрытие отдельных микроконтейнеров Полученные экспериментальные И ИХ групп. данные принципиальной свидетельствуют 0 возможности вскрытия массивов микроконтейнеров посредством лазерного излучения, в том числе на длинах волн более 1000 нм, что лежит в области второго биологического окна прозрачности, вызывающего широкий интерес научного сообщества.

5.2 Влияние термической обработки на проницаемость полиэлектролитных оболочек

Одной из приоритетных задач биоинженерии является иммобилизирование низкомолекулярных веществ, что обусловлено тем, что большинство препаратов, особенно противораковых, являются низкомолекулярными веществами. Однако инкапсуляция таких веществ является крайне сложной задачей, так как подобные вещества имеют свойство постепенно диффундировать и в настоящее время круг носителей, способных эффективно удерживать низкомолекулярные вещества крайне ограничен. Однако ограниченный спектр носителей также ограничивает число возможных применений системы доставки и ограничивает возможности дополнительной функционализации. В связи с этим, представляется важной задачей разработки иммобилизации протоколов инкапсулирования И низкомолекулярных веществ в системы доставки с возможностью доставки их к очагам заболевания (опухолям или патогенным клеткам) и возможностью управляемого их высвобождения в условиях организма. Обсуждаются результаты по влиянию термической обработки микроконтейнеров, сформированных мультислойными полиэлектролитными плёнками на массоперенос низкомолекулярных веществ из внешней среды через полиэлектролитную мультислойную пленку. Для достижения поставленной задачи была исследована суспензия полиэлектролитных микроконтейнеров, сформированных методом последовательной адсорбции полиэлектролитов на шаблонных частицах карбоната размером 4 Для формирования микроконтейнеров были кальция МКМ. использованы мультислои, состоящие из пар синтетических (PDADMAC/PSS)₄ и природных полиэлектролитов (DS/PArg)₄ (рисунок 26) [129].



Рисунок 26 – Изображения сканирующей электронной микроскопии шаблонных частиц, использованных для формирования микроконтейнеров (*a*, *d*);

полиэлектролитных микроконтейнеров состава (PDADMAC/PSS)₄ до (b) и после

(c) термической обработки при температуре 50°С и микроконтейнеров состава (DS/PArg)₄ до *(e)* и после *(f)* термической обработки при температуре 90°С

Для оценки массопереноса низкомолекулярных веществ через полиэлектролитную оболочку контейнеры были редиспергированы в растворе красителя родамин В с концентрацией 0,33 мг/мл. В обоих случаях суспензии обработке термической при температурах $50^{\circ}C$ подвергали в случае (PDADMAC/PSS)₄ и 90°С для состава (DS/PArg)₄. Термическая обработка оболочек полиэлектролитных приводит к перераспределению молекулярных [6,7,130] «цепей» в полиэлектролитных комплексах, формирующих оболочку, и сокращению числа свободных зарядов в оболочке и, как следствие, к сжатию капсул [29]. Предполагается, что при термической обработке контейнеров, массоперенос низкомолекулярного красителя из внешней среды через оболочку замедлится. Для получения информации о процессах массопереноса через полиэлектролитную оболочку варьировали концентрации микроконтейнеров в суспензии, не изменяя концентрацию красителя. Показано, что количество

красителя, прошедшего через оболочку и оставшегося внутри контейнеров при термической обработке, нелинейно изменяется с изменением концентрации контейнеров в суспензии (рисунок 27).



Рисунок 27 – Количество красителя, задержанного внутри контейнеров состава (PDADMAC/PSS)₄ (*a*) и (DS/PArg)₄ (*b*) до и после термической обработки и эффективность задерживания красителя внутри контейнеров после термической обработки относительно контрольного образца без нагрева (PDADMAC/PSS)₄ (*c*) и (DS/PArg)₄ (*d*)

При низких концентрациях микроконтейнеров в суспензии (10^9 контейнеров в мл) термическая обработка приводит к увеличению концентрации красителя, обнаруженного в контейнерах, на 30% по сравнению с контрольным образцом. С другой стороны, повышение концентрации микроконтейнеров до $6 \cdot 10^9$ в мл термическая обработка приводит к обратному эффекту и количество красителя, задержанного контейнерами, сокращается на 40% по сравнению с контрольным образцом (рисунок 27 *c*). Изменение динамики указывает на наличие разных

механизмов связывания красителя контейнерами, что может быть объяснено вкладом неравновесных зарядов в полиэлектролитных комплексах, которые связывают значительную часть родамина. По мере термической обработки капсул количество свободных зарядов в полиэлектролитной оболочке значительно сокращается, приводя к сокращению ее вклада в процесс связывания красителя Родамина Б, что сильнее сказывается в области высоких концентраций микроконтейнеров в связи с повышением отношения вклада оболочки в процесс к вкладу объема контейнеров. Таким образом, впервые показано, что термическая обработка действительно приводит сокращению массопереноса К низкомолекулярного модельного красителя Родамина Б через полиэлектролитную оболочку.

5.2.1 Захват и катализированный выпуск фталоцианина цинка

Возможность инкапсулирования реального низкомолекулярного терапевтического агента была продемонстирована на примере фотодинамического агента, фталоцианина цинка. Для обеспечения захвата фотодинамического красителя на основе фталоцианина цинка (Холосенс) была проведена температурная обработка суспензии микроконтейнеров в растворе данного красителя. Как было описано ранее [29], температурная обработка приводит к перераспределению полиэлектролитов в оболочке, что приводит к уменьшению проницаемости оболочек и улавливающего вещества внутри капсул. Холосенс является термически устойчивым соединением, что важно в случае процесса захвата методом термической обработки.

При температурной обработке при 80°С морфологические изменения в структуре синтезированных микроконтейнеров состава (DS/PArg)₄ можно увидеть на изображениях, полученных методами СЭМ, КЛСМ и АСМ (рисунок 28). После термической обработки оболочки полиэлектролитных микроконтейнеров становятся более плотными, что было оценено за счет уменьшения диаметра

контейнеров, при этом они сохраняют форму даже при высыхании. Изображения КЛСМ позволили оценить средний размер микроконтейнер, который составляет $4,95 \pm 0,65$ мкм для контрольного образца, а средний размер после термической обработки снижается до $3,78 \pm 0,4$ мкм (рисунок 28 *b1*, *b2*). При этом толщина оболочки снижается с $0,114 \pm 0,025$ мкм для контрольного образца до $0,073 \pm 0,009$ мкм после термической обработки в соответствии с измерениями АСМ (рисунок 28 *c1*, *c2*, *d1*, *d2*).



Рисунок 28 – Изображения микроконтейнеров, полученные методами СЭМ (*a1*, *a2*), КЛСМ (*b1*, *b2*) и АСМ (*c1*, *c2*, *d1*, *d2*): (*a1*, *b1*, *c1*) и (*c2*) показывают контрольный образец микрокапсул [DS/PArg]₄; (*a2*, *b2*, *d1*) и (*d2*) показывают микрокапсулы [DS/PArg]₄ после обработки при температуре 80°С в течение 1 часа

Как было описано выше, процессы массопереноса красителя через оболочку полиэлектролитных микроконтейнеров оцениваются по эффективности их захвата оболочками до и после термической обработки. Для этого проводится спектроскопический анализ концентраций красителя в надосадочном растворе, а также концентрация красителя после растворения суспензии полиэлектролитных микроконтейнеров. Как и ожидалось, загрузка капсул красителем возрастает с увеличением количества капсул в образцах исследуемого состава (рисунок 29 *a*). Согласно спектроскопическим измерениям концентрации холосенса в

надосадочной жидкости, оставшейся после процесса захвата холосенса микроконтейнерами, зависимость эффективности захвата от концентрации капсул находится в хорошей корреляции с результатами, описанными выше. При этом суспензия микроконтейнеров приобретает ярко-голубой цвет.



Рисунок 29 – Концентрация холосенса, определенная методом спектрометрии, в зависимости от концентрации микроконтейнеров состава [DS/PArg]₄ с термообработкой и без нее (80° в течение 60 мин): (*a*) незахваченный краситель в надосадочном растворе (вставка показывает расчетную концентрацию захваченного вещества); (*b*) количество красителя, приходящегося на один контейнер

В ходе описанной процедуры максимальная эффективность захвата красителя микроконтейнерами наблюдалась при максимальной концентрации капсул (9·10⁸ капсул на мл) и составила 73,8% после термической обработки и 77,8% для контрольного образца, что, согласно формуле (1), означает отрицательную относительную эффективность нагретого образца. Хотя относительная эффективность нагретых образцов положительна при более низких концентрациях микрокапсул (рисунок 30).



Рисунок 30 – Сравнительная эффективность процесса захвата холосенса микроконтейнерами состава [DS/PArg]₄ после температурной обработки при 80°C

в течение 60 минут относительно контрольного образца

Поскольку рассматриваемая концентрация капсул известна, и концентрации захваченного суспензией красителя определены, можно вычислить нагрузку, приходящуюся на один контейнер (рисунок 29 *b*).

Обнаружено, что максимальный захват красителя на один контейнер происходит в области концентрации от $3 \cdot 10^8$ до $6 \cdot 10^8$ микроконтейнеров на мл, что коррелирует с максимальной сравнительной эффективностью захвата микрокапсул при термообработке по сравнению с контрольным образцом с последующим резким снижением относительной эффективности при более высоких концентрациях контейнеров (рисунок 30).

По сути, термически обработанные образцы захватывают краситель эффективнее, однако, при определенной концентрации капсул (4·10⁸ штук на мл) наступает насыщение и дальнейшее увеличение эффективности с ростом концентрации происходит медленнее. Возможное объяснение этих результатов

состоит в том, что некоторая доля положительно заряженных молекул красителя связывается на нескомпенсированных зарядах в полимерной матрице оболочки.

Известно, что термическая обработка способствует перераспределению полимерных цепей в оболочках, что, в конечном счете, уменьшает количество свободных зарядов [29], полимер-полимерные взаимодействия становятся преобладающими и часть связанных в оболочках молекул красителя выходит в раствор. Очевидно, что влияние этого процесса становится более значительным с увеличением концентрации капсул. Таким образом, термически обработанные образцы захватывают только равновесную концентрацию целевого вещества внутри полости микроконтейнеров, что приводит к насыщению с увеличением количества микроконтейнеров, в то время как контрольный образец концентрирует заряженные молекулы красителя в оболочке с помощью нескомпенсированных зарядов.

Для проведения спектроскопических измерений связанного микроконтейнерами красителя, была проведена обработка суспензии αхимотрипсином. Высвобождение красителя из микроконтейнеров является медленным процессом, поэтому оно выполнялось в два этапа (рисунок 31).



Рисунок 31 – Профили диффузии холосенса из микроконтейнеров до и после термической обработки при ферментативной обработке суспензии

После 24 часов ферментативной обработки при 37°C образцы были отцентрифугированы надосадочный раствор отобран для И последующего спектроскопического анализа. Затем оставшийся осадок был повторно диспергирован в том же объеме раствора фермента на дополнительные 48 часов. После второго цикла обработки надосадочный раствор снова был отобран для анализа, и суммарная концентрация была рассчитана и взята, как высвобожденное количество красителя. Однако, стоит отметить, что даже после 72 часов обработки концентрация высвобожденного вещества была значительно ниже ожидаемой, исходя из концентрации несвязанного красителя, а оставшийся осадок сохранял ярко-синий цвет. Возможным объяснением является очень высокий заряд молекул фталоцианина цинка, что приводит к очень сильной связи с нерастворенными полимерными комплексами.

На рисунке 31 показана зависимость концентрации красителя в надосадочном растворе от времени ферментативной обработки. Установлено, что

концентрация холосенса в среде контрольного образца выше в 2 раза, чем в среде термически обработанной суспензии.

На рисунке 32 показан спектр поглощения фталоцианина цинка после захвата. Положение пиков абсорбции существенно не изменяется при процессе захвата, что означает, что холосенса успешно захватываются внутри микрокапсул без какой-либо молекулярной конверсии.



Рисунок 32 – Спектр поглощения фталоцианина цинка. Выделенный участок показывает перекрытие с длиной волны возбуждающего диода

5.2.2 Влияние PS-содержащих микрокапсул на раковые и нераковые клетки

Таким образом, были получены микроконтейнеры, содержащие фотосенсибилизатор на основе фталоцианина цинка. Такая система позволяет сочетать преимущества направленной доставки и фотодинамической терапии. Для исследования цитотоксического действия микроконтейнеров состава [DS/PArg]₄ использовали клеточные культуры HeLa (линия «бессмертных» клеток из раковой опухоли шейки матки) и NHDF (человеческие фибробласты). В связи с этим, суспензии микрокапсул, содержащих холосенс, смешивали при различной концентрации микрокапсул. Первоначально микрокапсулы прилипают К

поверхности клеток с последующей интернализацией. Как описано в работе [131], поглощение микрокапсул наиболее существенно в первые часы (рисунок 33 *a*).



Рисунок 33 – (*a*) Графики зависимости интернациализации по проточному цитометрическому анализу связывания капсул с клетками; (*b*) изображение КЛСМ клеток HeLa, инкубированных с микрокапсулами, содержащими холосенс,

в концентрации 3 капсулы на клетку в течение 24 ч при 37 °C

Клетки в количестве 10⁴ штук были исследованы в каждом образце, смешанном с суспензией микрокапсул в концентрации 10 микрокапсул на клетку. Уровень поглощения определяли, как среднюю интенсивность флуоресценции каждого образца по отношению к средней интенсивности флуоресценции контрольных неочищенных клеток, результаты показаны как среднее значение ± стандартное отклонение. Очевидно, интернализация капсул зависит от времени, и увеличение времени инкубации приводит к увеличению доли клеток с интернализованными капсулами. У нагретых капсул наблюдается сходное поведение, так как их размер меняется не значительно. Показано, что через 24 ч 90% инкубации почти клеток содержат капсулы, нагруженные RhD6G (рисунок 33 *a*).

В качестве контрольного эксперимента микрокапсулы инкубировали в буфере PBS в течение 24 ч при 37 °С. Было показано, что морфология капсул и концентрация фталоцианина цинка в среде соответствуют исходной суспензии.

Для изучения особенностей фотодинамически индуцированной клеточной инактивации была применена конфокальная микроскопия. На первом этапе, в качестве контрольного эксперимента, исследовали цитотоксическое действие фотосенсибилизатора холосенс в виде раствора. Для этого культуру клеток HeLa, смешанную с раствором холосенса, инкубировали в течение нескольких часов, а затем проводили визуализацию методом КЛСМ. Перед проведением эксперимента клеточная культура HeLa была окрашена флуоресцентным красителем кальцеин, который метаболизируется в цитоплазме живых клеток. Для индуцирования процесса окисления площадь около 450×450 мкм² была обработана лазером конфокального микроскопа длиной волны 680 нм в течение 5 минут. В качестве контрольного образца культуру клеток HeLa без фотосенсибилизатора так же обрабатывали лазерным излучением. В течение 5 и 10 минут облучения, какихлибо значительных изменений в контрольном образце клеток обнаружено не было (рисунок 34 *a*, *b*).



Рисунок 34 – Клетки HeLa, помеченные кальцеином: (*a*) и (*b*) показывают контрольный образец до (*a*) и после (*b*) облучения 680 лазером по площади в течение 10 минут; (*c* – *f*) показывают клетки HeLa, инкубированные с раствором фталоцианина цинка в концентрации, соответствующей 3 капсулам на клетку до (*c*, *e*) и после (*d*, *f*) облучения 680 лазером на площади в течение 5 минут

На следующем этапе капсулы были диспергированы в физиологическом растворе и добавлены в клеточную культуральную среду. Холосенс имеет яркий пик флуоресценции при длине волны 700 нм, что позволяет визуализировать содержащиеся в холосенсе капсулы, присутствующие в среде и внутри клеток. Показано, что клетки HeLa и NHDF способны поглощать большое количество капсул, сохраняя при этом морфологию (рисунок 33 *b*). Изображения КЛСМ показывают, что клетки с капсулами состава [DS/PArg]₄ после 24 часов культивирования имеют хорошую морфологию, типичную для прикрепленных клеток HeLa и NHDF, соответственно. Клетки прикреплены посредством псевдоподий к пластику и обладают высокой адгезией.

Для оценки цитотоксического эффекта различные концентрации микрокапсул (DS/PArg)₄, содержащих холосенс (в концентрации от 1 капсулы на

104

клетку до 60 капсул на клетку), инкубировали с культурами клеток HeLa и NHDF в течение 24 часов, а затем облучали лазерным диодом длиной волны 680 нм (рисунок 35). Инкубационный период сопровождается облучением отдельных ячеек с клеточными культурами светоизлучающим диодом на длине волны 680 нм в течение 7,5 минут при плотности мощности 80 мВт/см². Площадь светового пятна на поверхности пластины составляла около 0,8 см². Эффект облучения исследуют с помощью метаболических анализов HeLa, помеченных красителем на основе резазурина Alamar Blue.



Рисунок 35 – Изображения КЛСМ клеток HeLa до (*a*, *b*) и после (*c*, *f*) инкубации с суспензией ФС-содержащих микрокапсул состава [DS/PArg]₄ (в концентрации 3 капсулы на клетку) при 37 °C в течение 24 часов: (*a*) и (*b*) показывают клетки HeLa до и после облучения 680 нм лазером в течение 15 мин,соответственно; (*c*) и (*d*) показывают изображения клеток HeLa после инкубации с контрольными микрокапсулами до и после облучения лазером на длине волны 680 нм; (*e*) и (*f*) показывают изображения клеток HeLa, инкубированных с термически обработанными микрокапсулами до и после облучения лазером на длине волны 680 нм; (*g*) показывает график выживаемости клеток в зависимости от количества капсул, добавленных в культуральную среду после облучения 680 нм светоизлучающим диодом и без него, (*e*) показывает сравнение токсичности раствора холосенса и микрокапсул, содержащих холосенс

106

Данные показывают, что облучение светом на длине волны 680 нм приводит к значительному снижению сигнала флуоресценции (метаболической активности клеток), измеренного как для культур HeLa, так и для NHDF, пересчитанная из разницы интенсивностей флуоресценции выживаемость клеток составляет 40% (рисунок 35 g).

Показано, что клетки, инкубированные с микрокапсулами, содержащими холосенс, демонстрируют значительное снижение метаболической активности даже при низких концентрациях капсул (рисунок 35 g), а эффект цитотоксичности эффектом раствора холосенса при добавлении сравним В клеточную концентрации, аналогичной инкапсулированной культуральную среду, В (рисунок 35 *h*). Следует отметить, что сами микрокапсулы, содержащие холосенс, не обладают противораковыми свойствами без светового облучения, тогда как клетки NHDF значительно ингибируются при высоких концентрациях капсул (более 20 капсул на клетку) даже без облучения.

В случае, когда культура клеток HeLa была инкубирована с раствором холосенса, наблюдались значительные изменения в морфологии клеток (рисунок 34 *c*, *d*), сопровождающиеся образованием пузырьков на поверхности облученных клеток. Морфологические изменения с последующим снижением флуоресценции кальцеина в течение 20 минут указывают на инактивацию облученных клеток во всей облученной области (рисунок 34 *e*, *f*), как и предполагалось, поскольку холосенс эффективно адсорбируется на мембранах клеток.

В случае культуры клеток HeLa, инкубированной с микрокапсулами, контрольный эксперимент проводили в том же образце. Для этой цели была выбрана площадь размером 100×100 мкм², содержащая клетки без капсул, и облучалась в течение 10 минут лазером на длине волны 680 нм. Клетки подвергали повторному облучению в течение 20 минут после лазерной обработки и какие-либо изменения в морфологии и флуоресценции клеток не наблюдались (рисунок 34 *a*, *b*).

Напротив, в экспериментах с клетками, содержащими микрокапсулы, снижение интенсивности флуоресценции кальцеина было отмечено в течение 30 секунд обработки 680 нм лазером, указывающим на инактивацию клеток (рисунок 35 d, f). В некоторых случаях происходит образование пузырьков на поверхности мембран клеток, что может указывать на апоптоз (рисунок 35 f). При этом показано, что нескольких капсул в клетке достаточно, чтобы вызвать инактивацию клеток при облучении.

Таким образом, можно сделать вывод, что световое излучение индуцирует инактивацию 60% клеток как для культур HeLa, так и для HNDF. При добавлении капсул, содержащих фотосенсибилизатор, жизнеспособность культур HeLa и HNDF снижается до 2-3% при облучении светом на длине волны 680 нм. Следует отметить, что существенной разницы между термически обработанными и контрольными капсулами в фотодинамической эффективности не наблюдалось.

Поскольку время жизни синглетного кислорода составляет около нескольких мкс или менее, он способен окислять только молекулы, расположенные в непосредственной близости от места его генерации. В этой связи задача локализации микрокапсул-содержащих фотосенсибилизаторов внутри клетки становится важной, поскольку синглетный кислород может индуцировать апоптоз или некроз клеток в зависимости от местоположения его генерации. Например, повреждение молекулы ДНК [132] или разрушение митохондриальной мембраны [133] приводят к апоптозу клетки, тогда как повреждение цитоплазматической мембраны может индуцировать некроз клеток [134].

5.2.3 Выводы

Были изучены процессы захвата низкомолекулярного фотодинамического агента на основе фталоцианина цинка (холосенс) в зависимости от концентрации микрокапсул, состоящих из биодеградируемой пары полиэлектролитов.

108
Изменения эффективности захвата в зависимости от концентрации капсул указывают на разные вклады в процесс инкапсуляции. Возможной причиной является большое количество целевого вещества, содержащегося в оболочках капсул, с последующим выходом его из оболочек при температурной обработке.

Высокая цитотоксичность капсул, содержащих холосенс, под воздействием излучающего диода с длиной волны излучения 680 нм, была продемонстрирована с культурами клеток HeLa и NHDF. Цитометрия и конфокальная микроскопия позволяют заключить об эффективном поглощении микрокапсул состава [DS/PArg]₄ клетками HeLa и NHDF. Было показано, что всего несколько капсул достаточно, чтобы вызвать инактивацию клеток.

Полученные результаты показывают отсутствие существенной разницы в жизнеспособности клеток под действием фотодинамической обработки системы с использованием раствора холосенса, контрольных микрокрокапсул состава [DS/PArg]₄, содержащих холосенс или термически обработанных и содержащих холосенс микрокапсул состава [DS/PArg]₄. Следует отметить, что при этом термическая обработка позволяет микрокапсулам проявлять более высокую стабильность при более низком высвобождении холосенса в среду. Эти результаты демонстрируют возможность использования таких систем для селективной фотодинамической терапии на основе полиэлектролитных микрокапсул и фотосенсибилизаторов. фталоцианиновых Результаты по инкапсуляции низкомолекулярных веществ в полиэлектролитные капсулы были опубликованы в работе [129].

иммобилизирования Данные результаты подтверждают возможность низкомолекулярных веществ посредством полиэлектролитных капсул, что имеет большое значение для создания новых систем доставки низкомолекулярных терапевтических препаратов на основе мультислойных полиэлектролитных капсул. Такая перспективную система представляет альтернативу традиционным носителям для доставки лекарственных средств, таких как липосомы, и кроме того полученная система доставки выгодно отличается от уже имеющихся широкими возможностями по «настройке» их свойств под конкретные задачи.

109

5.3 Влияние электрического поля на полиэлектролитные микроконтейнеры, содержащие наночастицы магнетита

Другим неинвазивным фактором внешней среды, который позволяет воздействовать на объекты внутри тканей организма является электрическое поле, которое при определенных условиях является достаточно прозрачным для электрического и электромагнитного полей. В данной главе обсуждается влияние содержания наночастиц магнетита в оболочке композитных микроконтейнеров на их поведение во внешнем электрическом поле.

Как было показано в главах 3 и 4, неорганические наполнители в полимерной электрофизические матрице способны принципиально изменять свойства композита, повышая проводимость и другие характеристики пленки. Так показано, что наночастицы магнетита смещают проводимость полиэлектролитной плёнки, полученной методом последовательной адсорбции, в диапазон полупроводников. Кроме того, высокая диэлектрическая проводимость наночастиц магнетита также обеспечивает диэлектрическую проницаемость композита в диапазоне значений 13-20 в зависимости от состава, что может оказать сильное влияние на поведение микроконтейнеров нанокомпозитных полиэлектролитных BO внешнем электрическом поле. В данной главе рассматривается поведение суспензии полиэлектролитных композитных микроконтейнеров, содержащих наночастицы магнетита, под действием импульсов внешнего электрического поля.

Для этого по описанной методике были синтезированы микроконтейнеры, содержащие 1, 2 и 3 слоя наночастиц магнетита в оболочке:

a) PSS/PAH/BSA-TRITC/(PAH/PSS)5,

- b) PSS/PAH/BSA-TRITC/(PAH/PSS)₃/PAH/Fe₃O₄/PAH/PSS,
- c) PSS/PAH/BSA-TRITC/PAH/(PSS/PAH)₂/(Fe₃O₄/PAH)₂/PSS,
- d) PSS/PAH/BSA-TRITC/PAH/PSS/PAH/(Fe₃O₄/PAH)₃/PSS (рисунок 36).



Рисунок 36 – Схематическое изображение структур, использованных микроконтейнеров: (*a*) контрольный образец; (*b*-*d*) - микроконтейнеры, содержащие 1, 2 и 3 слоя наночастиц магнетита.

Предполагается, наличие наночастиц высокой что магнетита с диэлектрической проницаемостью повышает поляризуемость микроконтейнеров во внешнем электрическом поле. Таким образом, под действием внешнего электрического поля в полярных частях микроконтейнеров будет происходить накопление ионов, локально повышая ионную силу. Кроме того, это поле также приводит поляризации наночастиц магнетита К В полярных частях микроконтейнеров, что инициирует возникновение сил электростатического расталкивания между ними и, как следствие, к механическим напряжениям в оболочке. Очевидно, повышение концентрации наночастиц магнетита в оболочке будет усиливать данное явление [135].

Для оценки эффекта в суспензии нанокомпозитных полиэлектролитных микроконтейнеров действием под внешнего электрического поля была использована стандартная установка для электропорации. В кювету с электродами 1 MM была добавлена водная суспензия полиэлектролитных с зазором микроконтейнеров в концентрации 19·10⁶ шт/мл. Были использованы суспензии нанокомпозитных микроконтейнеров, содержащие в оболочке от 1 до 3-х слоев наночастиц магнетита с характерным размером 6 ± 1,3 нм. На электроды кюветы электропоратора импульсно подавали разность потенциалов U = 1 кВ длиной $\tau=1\cdot 10^{\text{-3}}$ с, при этом зазор между электродами составлял L = 1 мм. Разность

потенциалов, возникающая при этом между полярными частями полиэлектролитных микроконтейнеров, была оценена в 11 мВ. На рисунке 37 видно, что в зависимости от числа слоев магнетита в оболочке под действием электрического поля в суспензии образуются агрегаты, бусы, а также происходит деформация микроконтейнеров, что сопровождается значительным снижением концентрации микроконтейнеров в суспензии (рисунок 38).



Рисунок 37 – Изображения суспензии микроконтейнеров после приложения электрического поля напряженность 1 кВ/см, полученные методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии: (*a*) - контрольный образец PSS/PAH/BSA-TRITC/(PAH/PSS)₅; (*б-г*) - микроконтейнеры, содержащие 1, 2 и 3 слоя наночастиц магнетита, соответственно составов: PSS/PAH/BSA-TRITC/(PAH/PSS)₃/PAH/Fe₃O₄/PAH/PSS; PSS/PAH/BSA-TRITC/PAH/(PSS/PAH)₂/(Fe₃O₄/PAH)₂/PSS; PSS/PAH/BSA-TRITC/PAH/(PSS/PAH/(Fe₃O₄/PAH)₂/PSS;



Рисунок 38 – Концентрация микроконтейнеров в суспензии после приложения электрического поля напряженностью 1 кВ/см в зависимости от числа слоев наночастиц магнетита в оболочке нанокомпозитных микроконтейнеров

Эффект агрегации, объединения в бусы, деформации и разрушения в проведенном эксперименте объясняется наличием в составе полиэлектролитной оболочки наночастиц магнетита с высокой диэлектрической проницаемостью, что способствует усилению локального электрического поля вблизи оболочки микроконтейнеров за счет поляризации наночастиц магнетита. Кроме того, частицы под действием электрического поля вступают друг с другом в дипольдипольное взаимодействие, что приводит к механическим напряжениям в оболочке микроконтейнеров.

Таким образом, показан нетермический метод дистанционного вскрытия микроконтейнеров посредством приложения импульсов электрического поля. Результаты по воздействию электрического поля на микрокапсулы, функционализированные наночастицами магнетита опубликованы в работах [135–137].

113

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Впервые продемонстрирована возможность создания композитных пленок и микроконтейнеров на основе полиэлектролитов и неорганических наноструктур методом последовательной адсорбции слоев полиэлектролитов и инфильтрации через пленки неорганических солей. Указанная возможность реализована на примере образования неорганической фазы карбоната кальция в полиэлектролитной пленке с массивом микроконтейнеров, сформированных мультислоями (PSS/PAH)₄₀ и (PSS/PDADMAC)₁₀ в результате инфильтрации насыщенными растворами солей CaCl₂ и Na₂CO₃. Показано, что масса карбоната кальция растет пропорционально числу циклов инфильтрации пленки солевыми растворами.

2. Установлено, что образование неорганической фазы карбоната кальция усиливает механические свойства композитной пленки, которые максимальны при массовой доле CaCO₃ 15%; наибольшие значения модуля упругости получены для композитной пленки, состоящей из многослойных полиэлектролитов на основе (PSS/PAH)₄₀. Установлено, что при массовой доле карбоната кальция 15% значения модуля Юнга для композитов на основе пар полиэлектролитов (PSS/PAH) и (PSS/PDADMAC) увеличиваются в 3,3 и 2,9 раза, соответственно, по сравнению с неминерализованными образцами.

3. Методом последовательной адсорбции полиэлектролитов с использованием деградируемого шаблона на основе полиметилметакрилата синтезированы композитные пленки и микроконтейнеры, содержащие оксид графена состава ((PSS/PAH)_x/OГ/PAH)_y (где x=5-12 y=1-7). Показано, что оксид графена преимущественно распределяется в стенках микроконтейнеров, и оптимальное число его слоев не превышает трёх. Установлена возможность управления одновременно механическими и оптическими характеристиками композитной пленки варьированием содержания оксида графена в ее структуре. Допирование тремя слоями оксида графена пленок микроконтейнеров усиливает

механические свойства: предел прочности увеличивается в 2,78 раза, модуль Юнга в области упругой деформации возрастает в 5,6 раза по сравнению с исходной полиэлектролитной пленкой.

4. Полученные композитные пленки на основе полиэлектролитов и углеродных наноструктур интенсивно поглощают свет в широком диапазоне длин волн, что позволило использовать лазерное излучение для вскрытия композитных пленок и микроконтейнеров на их основе и осуществить высвобождение инкапсулированного в них модельного красителя Судана III. Воздействие лазерного излучения на длинах волн 530 нм, 800 нм, 1000 нм и 1200 нм разрушает полые микроконтейнеры с включенными углеродными наноструктурами.

5. Исследование температурного воздействия на физико-химические свойства полиэлектролитных микроконтейнеров различного состава показало, что термическая обработка полиэлектролитных пленок при 180 °C в течение 3-х часов в присутствии декстрана сульфата приводит к образованию наноразмерных углеродных структур, флуоресценцией с максимумом эмиссии при 480 нм. Формирование углеродных наноструктур таких В пленке с массивом микроконтейнеров повышает ее проводимость на 2 порядка по сравнению с исходными полиэлектролитными пленками. На примере микроконтейнеров (PDADMAC/PSS)₄ состава показано, что температурная обработка полиэлектролитных оболочек микроконтейнеров значительно снижает их проницаемость и, как следствие, уменьшает массоперенос модельного красителя Родамина Б на 30%.

6. Показано, что наличие наночастиц магнетита в полиэлектролитной оболочке позволяет управлять проводимостью и поведением композитных микроконтейнеров во внешнем электрическом поле, в частности, приводит к агрегации и разрушению микроконтейнеров. Также установлено, что процент разрушенных микроконтейнеров увеличивается с ростом числа слоев магнетита при постоянной напряженности электрического поля. Так, в случае одного слоя наночастиц магнетита в оболочке действие электрического поля напряженностью

115

1 кВ/с приводит к снижению концентрации микроконтейнеров в суспензии на 2 порядка, а при 3-х слоях НЧ магнетита их концентрация падает на 7 порядков.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ИК Инфракрасный
- PSS Поли(стиролсульфонат) натрия
- РАН Поли(аллиламина гидрохлорид)
- DS Сульфат декстрана натриевая соль
- PDADMAC Полидиаллилдиметиламмония хлорид
- PArg Поли-L-аргинин гидрохлорид
- РЕ Полиэтиленимин
- ОГ Оксид графена
- ЛБЛ Метод «слой за слоем» (Layer-by-Layer)
- ФИТЦ Флуоресцеин изотиоцианат
- ЭДТА Тринатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты
- ПДМС Полидиметилсилоксан
- ПЭМ Полиэлектролитный мультислой
- СЭМ Сканирующая электронная микроскопия
- ТГА Термогравиметрический анализ
- DMEM Модифицированная среда Орла Дульбекко
- PBS Натрий-фосфатный буфер
- NHDF Фибробласты кожи человека
- АСМ Атомно-силовая микроскопия
- ЭРС Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия
- ПММА Полиметилметакрилат
- ПЭОГМ Мультислой состава полиэлектролит/оксид графена
- КЛСМ Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия
- RhD6G Родамин 6G
- ВАХ вольтамперная характеристика

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

 Stuart, M.A.C. Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials / M.A.C. Stuart, W.T.S. Huck, J. Genzer, M. Müller, C. Ober, M. Stamm, G.B. Sukhorukov, I. Szleifer, V. V. Tsukruk, M. Urban, F. Winnik, S. Zauscher, I. Luzinov, S. Minko // Nature Materials. – 2010. – V.2 (9). – P. 101–113.

2. Decher, G. Multilayer thin films sequential assembly of nanocomposite materials / G. Decher, J.B. Schlenoff. – Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012. – 510 p.

 Malikova, N. Layer-by-layer assembled mixed spherical and planar gold nanoparticles: Control of interparticle interactions / N. Malikova, I. Pastoriza-Santos, M. Schierhorn, N.A. Kotov, L.M. Liz-Marzán // Langmuir. – 2002. – V.9 (18). – P. 3694–3697.

4. Podsiadlo, P. Polymer/clay and polymer/carbon nanotube hybrid organic–inorganic multilayered composites made by sequential layering of nanometer scale films / P. Podsiadlo, B.S. Shim, N.A. Kotov // Coordination Chemistry Reviews. – 2009. – V.23–24 (253). – P. 2835–2851.

5. Chong, K.S.L. Large area patterning of single-wall carbon nanotubes by nanoimprint technology / K.S.L. Chong, M. V. Kiryukhin, A.M.H. Ng // Thin Solid Films. – 2012. – (526). – P. 252–255.

6. Shah, N.J. Osteophilic multilayer coatings for accelerated bone tissue growth / N.J.
Shah, J. Hong, M.N. Hyder, P.T. Hammond // Advanced Materials. – 2012. – V.11 (24).
– P. 1445–1450.

7. Sukhorukov, G.B. Stepwise polyelectrolyte assembly on particle surfaces: a novel approach to colloid design / G.B. Sukhorukov, E. Donath, S. Davis, H. Lichtenfeld, F. Caruso, V.I. Popov, H. Möhwald // Polymers for Advanced Technologies. – 1998. – (767). – P. 759–767.

8. Donath, E. Novel Hollow Polymer Shells by Colloid-Templated Assembly of Polyelectrolytes / E. Donath, G.B. Sukhorukov, F. Caruso, S.A. Davis, H. Möhwald // Angewandte Chemie International Edition. – 1998. – V.16 (37). – P. 2201–2205.

9. Shchukin, D.G. Micron-scale hollow polyelectrolyte capsules with nanosized magnetic Fe3O4 inside / D.G. Shchukin, I.L. Radtchenko, G.B. Sukhorukov // Materials Letters. – 2003. – V.11 (57). – P. 1743–1747.

10. Shchukin, D.G. Nanoparticle Synthesis in Engineered Organic Nanoscale Reactors /
D.G. Shchukin, G.B. Sukhorukov // Advanced Materials. – 2004. – V.8 (16). – P. 671–
682.

11. Förster, S. From self-organizing polymers to nanohybrid and biomaterials. / S.
Förster, T. Plantenberg // Angewandte Chemie (International ed. in English). – 2002. –
V.5 (41). – P. 689–714.

12. Richards Grayson, A. Electronic MEMS for triggered delivery / A. Richards Grayson
// Advanced Drug Delivery Reviews. - 2004. - V.2 (56). - P. 173–184.

13. Kiryukhin, M. V. Fabrication and mechanical properties of microchambers made of polyelectrolyte multilayers / M. V. Kiryukhin, S.M. Man, S.R. Gorelik, G.S. Subramanian, H.Y. Low, G.B. Sukhorukov // Soft Matter. – 2011. – V.14 (7). – P. 6550.

14. Kiryukhin, M. V. Adhesion of polyelectrolyte multilayers: Sealing and transfer of microchamber arrays / M. V. Kiryukhin, S.M. Man, A. Tonoyan, H.Y. Low, G.B. Sukhorukov // Langmuir. – 2012. – V.13 (28). – P. 5678–5686.

15. Kiryukhin, M. V. Individually addressable patterned multilayer microchambers for site-specific release-on-demand / M. V. Kiryukhin, S.R. Gorelik, S.M. Man, G.S. Subramanian, M.N. Antipina, H.Y. Low, G.B. Sukhorukov // Macromolecular Rapid Communications. – 2013. – V.1 (34). – P. 87–93.

16. Yin, Y. Self-assembly of monodispersed spherical colloids into complex aggregates with well-defined sizes, shapes, and structures / Y. Yin, Y. Xia // Advanced Materials. –

2001. – V.4 (13). – P. 267–271.

17. Kiryukhin, M. V. Peculiarities of polyelectrolyte multilayer assembly on patterned surfaces / M. V. Kiryukhin, S.M. Man, A. V. Sadovoy, H.Y. Low, G.B. Sukhorukov // Langmuir. – 2011. – V.13 (27). – P. 8430–8436.

18. Gao, C. Elasticity of hollow polyelectrolyte capsules prepared by the layer-by-layer technique / C. Gao, E. Donath, S. Moya, V. Dudnik, H. Mohwald // European Physical Journal E. -2001. - V.1 (5). -P.21-27.

19. Nolte, A.J. Determining the Young's modulus of polyelectrolyte multilayer films via stress-induced mechanical buckling instabilities / A.J. Nolte, M.F. Rubner, R.E. Cohen // Macromolecules. – 2005. – V.13 (38). – P. 5367–5370.

20. Vinogradova, O.I. Multilayer DNA/poly(allylamine hydrochloride) microcapsules: Assembly and mechanical properties / O.I. Vinogradova, O. V. Lebedeva, K. Vasilev, H. Gong, J. Garcia-Turiel, B.S. Kim // Biomacromolecules. – 2005. – V.3 (6). – P. 1495– 1502.

21. Moya, S. Microencapsulation of organic solvents in polyelectrolyte multilayer micrometer-sized shells / S. Moya, G.B. Sukhorukov, M. Auch, E. Donath, H. Möhwald // Journal of Colloid and Interface Science. – 1999. – V.2 (216). – P. 297–302.

22. Cock, L.J. De Polymeric Multilayer Capsules in Drug Delivery / L.J. De Cock, S. De Koker, B.G. De Geest, J. Grooten, C. Vervaet, J.P. Remon, G.B. Sukhorukov, M.N. Antipina // Angewandte Chemie International Edition. – 2010. – V.39 (49). – P. 6954–6973.

23. Mendes, P.M. Stimuli-responsive surfaces for bio-applications / P.M. Mendes // Chemical Society Reviews. – 2008. – V.11 (37). – P. 2512.

24. Rydzek, G. Polymer multilayer films obtained by electrochemically catalyzed click chemistry / G. Rydzek, J.S. Thomann, N. Ben Ameur, L. Jierry, P. Mésini, A. Ponche, C. Contal, A.E. El Haitami, J.C. Voegel, B. Senger, P. Schaaf, B. Frisch, F. Boulmedais //

Langmuir. – 2010. – V.4 (26). – P. 2816–2824.

25. Zahn, R. Swelling of electrochemically active polyelectrolyte multilayers / R. Zahn,
J. Vörös, T. Zambelli // Current Opinion in Colloid & Interface Science. – 2010. – V.6 (15). – P. 427–434.

26. Baba, A. Electrochemical surface plasmon resonance and waveguide-enhanced glucose biosensing with N-alkylaminated polypyrrole/glucose oxidase multilayers / A. Baba, P. Taranekar, R.R. Ponnapati, W. Knoll, R.C. Advincula // ACS Applied Materials and Interfaces. – 2010. – V.8 (2). – P. 2347–2354.

27. Wang, H. All-metal layer-by-layer films: Bimetallic alternate layers with accessible mesopores for enhanced electrocatalysis / H. Wang, S. Ishihara, K. Ariga, Y. Yamauchi // Journal of the American Chemical Society. – 2012. – V.26 (134). – P. 10819–10821.

28. Geest, B.G. De Stimuli-responsive multilayered hybrid nanoparticle/polyelectrolyte capsules / B.G. De Geest, A.G. Skirtach, T.R.M. De Beer, G.B. Sukhorukov, L. Bracke, W.R.G. Baeyens, J. Demeester, S.C. De Smedt // Macromolecular Rapid Communications. – 2007. – V.1 (28). – P. 88–95.

29. Köhler, K. Thermal behavior of polyelectrolyte multilayer microcapsules. 1. The effect of odd and even layer number / K. Köhler, D.G. Shchukin, H. Möhwald, G.B. Sukhorukov // Journal of Physical Chemistry B. – 2005. – V.39 (109). – P. 18250–18259.

30. Ibarz, G. Controlled permeability of polyelectrolyte capsules via defined annealing / G. Ibarz, L. Dähne, E. Donath, H. Möhwald // Chemistry of Materials. – 2002. – V.10 (14). – P. 4059–4062.

31. Déjugnat, C. Membrane densification of heated polyelectrolyte multilayer capsules characterized by soft X-ray microscopy / C. Déjugnat, K. Köhler, M. Dubois, G.B. Sukhorukov, H. Möhwald, T. Zemb, P. Guttmann // Advanced Materials. – 2007. – V.10 (19). – P. 1331–1336.

32. Soltwedel, O. Influence of polycation (PDADMAC) weight on vertical diffusion

within polyelectrolyte multilayers during film formation and postpreparation treatment / O. Soltwedel, P. Nestler, H.G. Neumann, M. Paßvogel, R. Köhler, C.A. Helm // Macromolecules. – 2012. – V.19 (45). – P. 7995–8004.

33. Timko, B.P. Remotely Triggerable Drug Delivery Systems / B.P. Timko, T. Dvir,
D.S. Kohane // Advanced Materials. - 2010. - V.44 (22). - P. 4925-4943.

34. Unger, E.C. Gene delivery using ultrasound contrast agents / E.C. Unger, E. Hersh,
M. Vannan, T.P. McCreery // Echocardiography (Mount Kisco, N.Y.). – 2001. – V.4 (18).
– P. 355–61.

35. Skirtach, A.G. Ultrasound stimulated release and catalysis using polyelectrolyte multilayer capsules / A.G. Skirtach, B.G. De Geest, A. Mamedov, A.A. Antipov, N.A. Kotov, G.B. Sukhorukov // Journal of Materials Chemistry. – 2007. – V.11 (17). – P. 1050–1054.

36. Yashchenok, A.M. Enzyme reaction in the pores of CaCO3 particles upon ultrasound disruption of attached substrate-filled liposomes / A.M. Yashchenok, M. Delcea, K. Videnova, E.A. Jares-Erijman, T.M. Jovin, M. Konrad, H. Möhwald, A.G. Skirtach // Angewandte Chemie - International Edition. – 2010. – V.44 (49). – P. 8116–8120.

37. Lu, Z. Magnetic switch of permeability for polyelectrolyte microcapsules embedded with Co@Aunanoparticles / Z. Lu, M.D. Prouty, Z. Quo, V.O. Golub, C.S.S.R. Kumar, Y.M. Lvov // Langmuir. – 2005. – V.5 (21). – P. 2042–2050.

38. Katagiri, K. Magnetoresponsive smart capsules formed with polyelectrolytes, lipid bilayers and magnetic nanoparticles / K. Katagiri, M. Nakamura, K. Koumoto // ACS Applied Materials and Interfaces. -2010. - V.3 (2). - P. 768–773.

39. Gorin, D.A. Magnetic/gold nanoparticle functionalized biocompatible microcapsules with sensitivity to laser irradiation / D.A. Gorin, S.A. Portnov, O.A. Inozemtseva, Z. Luklinska, A.M. Yashchenok, A.M. Pavlov, A.G. Skirtach, H. Möhwald, G.B. Sukhorukov // Physical Chemistry Chemical Physics. – 2008. – V.45 (10). – P. 6899.

40. Tzvetkov, G. In situ characterization of gas-filled microballoons using soft X-ray microspectroscopy / G. Tzvetkov, B. Graf, P. Fernandes, A. Fery, F. Cavalieri, G. Paradossi, R.H. Fink // Soft matter. – 2008. – V.3 (4). – P. 510–514.

41. Javier, A.M. Uptake of colloidal polyelectrolyte-coated particles and polyelectrolyte multilayer capsules by living cells / A.M. Javier, O. Kreft, M. Semmling, S. Kempter, A.G. Skirtach, O.T. Bruns, P. Del Pino, M.F. Bedard, J. Rädler, J. Käs, C. Plank, G.B. Sukhorukov, W.J. Parak // Advanced Materials. – 2008. – V.22 (20). – P. 4281–4287.

42. Yashchenok, A.M. Carbon nanotubes on polymeric microcapsules: Freestanding structures and point-wise laser openings / A.M. Yashchenok, D.N. Bratashov, D.A. Gorin, M. V. Lomova, A.M. Pavlov, A. V. Sapelkin, B.S. Shim, G.B. Khomutov, N.A. Kotov, G.B. Sukhorukov, H. Möhwald, A.G. Skirtach // Advanced Functional Materials. – 2010. – V.18 (20). – P. 3136–3142.

43. Fernandes, P.A.L. Quantification of release from microcapsules upon mechanical deformation with AFM / P.A.L. Fernandes, M. Delcea, A.G. Skirtach, H. Möhwald, A. Fery // Soft Matter. – 2010. – V.9 (6). – P. 1879.

44. Palankar, R. Mechanical strength and intracellular uptake of CaCO3-templated LbL capsules composed of biodegradable polyelectrolytes: the influence of the number of layers / R. Palankar, B.-E. Pinchasik, S. Schmidt, B.G. De Geest, A. Fery, H. Möhwald, A.G. Skirtach, M. Delcea // Journal of Materials Chemistry B. – 2013. – V.8 (1). – P. 1175.

45. Antipina, M.N. Remote control over guidance and release properties of composite polyelectrolyte based capsules / M.N. Antipina, G.B. Sukhorukov // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2011. – V.9 (63). – P. 716–729.

46. Roggan, A. Optical Properties of Circulating Human Blood in the Wavelength Range 400–2500 nm / A. Roggan, M. Friebel, K. Dörschel, A. Hahn, G. Müller // Journal of Biomedical Optics. – 1999. – V.1 (4). – P. 36.

47. Skirtach, A.G. Remote activation of capsules containing Ag nanoparticles and IR dye

by laser light / A.G. Skirtach, A.A. Antipov, D.G. Shchukin, G.B. Sukhorukov // Langmuir. – 2004. – V.17 (20). – P. 6988–6992.

48. Kohler, D. Patchiness of embedded particles and film stiffness control through concentration of gold nanoparticles / D. Kohler, N. Madaboosi, M. Delcea, S. Schmidt, B.G. De Geest, D. V. Volodkin, H. Möhwald, A.G. Skirtach // Advanced Materials. – 2012. – V.8 (24). – P. 1095–1100.

49. Skirtach, A.G. Nanoparticles distribution control by polymers: Aggregates versus nonaggregates / A.G. Skirtach, C. Déjugnat, D. Braun, A.S. Susha, A.L. Rogach, G.B. Sukhorukov // Journal of Physical Chemistry C. – 2007. – V.2 (111). – P. 555–564.

50. Muñoz Javier, A. Uptake of Colloidal Polyelectrolyte-Coated Particles and Polyelectrolyte Multilayer Capsules by Living Cells / A. Muñoz Javier, O. Kreft, M. Semmling, S. Kempter, A.G. Skirtach, O.T. Bruns, P. del Pino, M.F. Bedard, J. Rädler, J. Käs, C. Plank, G.B. Sukhorukov, W.J. Parak // Advanced Materials. – 2008. – V.22 (20). – P. 4281–4287.

51. Bédard, M. Optically driven encapsulation using novel polymeric hollow shells containing an azobenzene polymer / M. Bédard, A.G. Skirtach, G.B. Sukhorukov // Macromolecular Rapid Communications. – 2007. – V.15 (28). – P. 1517–1521.

52. Koo, H.Y. UV-triggered encapsulation and release from polyelectrolyte microcapsules decorated with photoacid generators / H.Y. Koo, H.-J. Lee, J.K. Kim, W.S. Choi // Journal of Materials Chemistry. – 2010. – V.19 (20). – P. 3932.

53. Skirtach, A.G. Reversibly permeable nanomembranes of polymeric microcapsules / A.G. Skirtach, P. Karageorgiev, M.F. Bédard, G.B. Sukhorukov, H. Möhwald // Journal of the American Chemical Society. – 2008. – V.35 (130). – P. 11572–11573.

54. Skirtach, A.G. Nanorods as wavelength-selective absorption centers in the visible and near-infrared regions of the electromagnetic spectrum / A.G. Skirtach, P. Karageorgiev, B.G. De Geest, N. Pazos-Perez, D. Braun, G.B. Sukhorukov // Advanced Materials. – 2008. – V.3 (20). – P. 506–510.

55. Erokhina, S. Light-driven release from polymeric microcapsules functionalized with bacteriorhodopsin / S. Erokhina, L. Benassi, P. Bianchini, A. Diaspro, V. Erokhin, M.P. Fontana // Journal of the American Chemical Society. – 2009. – V.28 (131). – P. 9800–9804.

56. Bédard, M.F. Assembling polyelectrolytes and porphyrins into hollow capsules with laser-responsive oxidative properties / M.F. Bédard, S. Sadasivan, G.B. Sukhorukov, A. Skirtach // Journal of Materials Chemistry. – 2009. – V.15 (19). – P. 2226.

57. Gregersen, K.A.D. Intracellular delivery of bioactive molecules using lightaddressable nanocapsules / K.A.D. Gregersen, Z.B. Hill, J.C. Gadd, B.S. Fujimoto, D.J. Maly, D.T. Chiu // ACS Nano. – 2010. – V.12 (4). – P. 7603–7611.

58. Palankar, R. Controlled intracellular release of peptides from microcapsules enhances antigen presentation on MHC class I molecules / R. Palankar, A.G. Skirtach, O. Kreft, M. Bédard, M. Garstka, K. Gould, H. Möhwald, G.B. Sukhorukov, M. Winterhalter, S. Springer // Small. – 2009. – V.19 (5). – P. 2168–2176.

59. Pavlov, A.M. Neuron Cells Uptake of Polymeric Microcapsules and Subsequent Intracellular Release / A.M. Pavlov, A. V. Sapelkin, X. Huang, K.M.Y. P'ng, A.J. Bushby, G.B. Sukhorukov, A.G. Skirtach // Macromolecular Bioscience. – 2011. – V.6 (11). – P. 848–854.

60. Luo, J.J. Characterization and modeling of mechanical behavior of polymer/clay nanocomposites / J.J. Luo, I.M. Daniel // Composites Science and Technology. – 2003. – V.11 (63). – P. 1607–1616.

61. Park, C. Il The fabrication of syndiotactic polystyrene/organophilic clay nanocomposites and their properties / C. Il Park, O.O. Park, J.G. Lim, H.J. Kim // Polymer. – 2001. – V.17 (42). – P. 7465–7475.

62. Alexandre, M. Polymer-layered silicate nanocomposites: Preparation, properties and uses of a new class of materials / M. Alexandre, P. Dubois // Materials Science and Engineering R: Reports. – 2000. – V.1 (28). – P. 1–63.

63. Gorga, R.E. Toughness enhancements in poly(methyl methacrylate) by addition of oriented multiwall carbon nanotubes / R.E. Gorga, R.E. Cohen // Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics. – 2004. – V.14 (42). – P. 2690–2702.

64. Kotha, S.P. Shear-lag model to account for interaction effects between inclusions in composites reinforced with rectangular platelets / S.P. Kotha, S. Kotha, N. Guzelsu // Composites Science and Technology. – 2000. – V.11 (60). – P. 2147–2158.

65. Chen, B. A characteristic length for stress transfer in the nanostructure of biological composites / B. Chen, P.D. Wu, H. Gao // Composites Science and Technology. – 2009.
– V.7–8 (69). – P. 1160–1164.

66. Kim, H. Graphene/Polymer Nanocomposites / H. Kim, A.A. Abdala, C.W. Macosko // Macromolecules. – 2010. – V.16 (43). – P. 6515–6530.

67. Lee, C. Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene / C. Lee, X. Wei, J.W. Kysar, J. Hone // Science. – 2008. – V.5887 (321). – P. 385–388.

68. Novoselov, K.S. Electric field effect in atomically thin carbon films. / K.S. Novoselov, A.K. Geim, S. V Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V Dubonos, I. V Grigorieva, A.A. Firsov // Science (New York, N.Y.). – 2004. – V.5696 (306). – P. 666–9.

69. Mermin, N.D. Crystalline order in two dimensions / N.D. Mermin // Physical Review. – 1968. – V.1 (176). – P. 250–254.

70. Orlita, M. Approaching the Dirac Point in High-Mobility Multilayer Epitaxial Graphene / M. Orlita, C. Faugeras, P. Plochocka, P. Neugebauer, G. Martinez, D.K. Maude, A.-L. Barra, M. Sprinkle, C. Berger, W.A. de Heer, M. Potemski // Physical Review Letters. – 2008. – V.26 (101). – P. 267601.

71. Balandin, A.A. Superior thermal conductivity of single-layer graphene / A.A. Balandin, S. Ghosh, W. Bao, I. Calizo, D. Teweldebrhan, F. Miao, C.N. Lau // Nano

Letters. - 2008. - V.3 (8). - P. 902-907.

72. Dikin, D.A. Preparation and characterization of graphene oxide paper / D.A. Dikin,
S. Stankovich, E.J. Zimney, R.D. Piner, G.H.B. Dommett, G. Evmenenko, S.T. Nguyen,
R.S. Ruoff // Nature. - 2007. - V.7152 (448). - P. 457-460.

73. Paci, J.T. Computational studies of the structure, behavior upon heating and mechanical properties of graphite oxide / J.T. Paci, T. Belytschko, G.C. Schatz // Journal of Physical Chemistry C. – 2007. – V.49 (111). – P. 18099–18111.

74. Stankovich, S. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide / S. Stankovich, D.A. Dikin, R.D. Piner, K.A. Kohlhaas, A. Kleinhammes, Y. Jia, Y. Wu, S.B.T. Nguyen, R.S. Ruoff // Carbon. – 2007. – V.7 (45). – P. 1558–1565.

75. Brodie, B.C. On the Atomic Weight of Graphite / B.C. Brodie // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. – 1859. – V.0 (149). – P. 249–259.

76. Staudenmaier, L. Verfahren zur Darstellung der Graphitsäure / L. Staudenmaier // Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. – 1898. – V.2 (31). – P. 1481–1487.

77. McAllister, M.J. Single sheet functionalized graphene by oxidation and thermal expansion of graphite / M.J. McAllister, J.L. Li, D.H. Adamson, H.C. Schniepp, A.A. Abdala, J. Liu, M. Herrera-Alonso, D.L. Milius, R. Car, R.K. Prud'homme, I.A. Aksay // Chemistry of Materials. – 2007. – V.18 (19). – P. 4396–4404.

78. Bourlinos, A.B. Graphite oxide: Chemical reduction to graphite and surface modification with primary aliphatic amines and amino acids / A.B. Bourlinos, D. Gournis, D. Petridis, T. Szabó, A. Szeri, I. Dékány // Langmuir. – 2003. – V.15 (19). – P. 6050–6055.

79. Kai, W. Thermal and mechanical properties of a Poly(ε-caprolactone)/graphite oxide composite / W. Kai, Y. Hirota, L. Hua, Y. Inoue // Journal of Applied Polymer Science.
- 2008. - V.3 (107). - P. 1395–1400.

80. Kotov, N.A. Ultrathin graphite oxide-polyelectrolyte composites prepared by selfassembly: Transition between conductive and non-conductive states / N.A. Kotov, I. Dékány, J.H. Fendler // Advanced Materials. – 1996. – V.8 (8). – P. 637–641.

81. Bai, H. A pH-sensitive graphene oxide composite hydrogel / H. Bai, C. Li, X. Wang,
G. Shi // Chemical communications (Cambridge, England). – 2010. – V.14 (46). – P.
2376–2378.

82. Bao, C. Preparation of graphene by pressurized oxidation and multiplex reduction and its polymer nanocomposites by masterbatch-based melt blending / C. Bao, L. Song, W. Xing, B. Yuan, C.A. Wilkie, J. Huang, Y. Guo, Y. Hu // Journal of Materials Chemistry. – 2012. – V.13 (22). – P. 6088.

83. Kuilla, T. Recent advances in graphene based polymer composites / T. Kuilla, S. Bhadra, D.H. Yao, N.H. Kim, S. Bose, J.H. Lee // Progress in Polymer Science. – 2010.
– V.11 (35). – P. 1350–1375.

84. Cai, D. The mechanical properties and morphology of a graphite oxide nanoplatelet/polyurethane composite / D. Cai, K. Yusoh, M. Song // Nanotechnology. – 2009. – V.8 (20). – P. 085712.

85. Li, S.-S. Solution-processable graphene oxide as an efficient hole transport layer in polymer solar cells / S.-S. Li, K.-H. Tu, C.-C. Lin, C.-W. Chen, M. Chhowalla // ACS nano. -2010. - V.6 (4). - P. 3169–3174.

86. Gong, L. Interfacial Stress Transfer in a Graphene Monolayer Nanocomposite / L.
Gong, I.A. Kinloch, R.J. Young, I. Riaz, R. Jalil, K.S. Novoselov // Advanced Materials.
– 2010. – V.24 (22). – P. 2694–2697.

87. Rho, J.Y. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone / J.Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, P. Zioupos // Medical Engineering and Physics. – 1998. – V.2 (20). – P. 92–102.

88. Silva, H.S. Molecular ordering of layer-by-layer polyelectrolyte films studied by sum-

frequency vibrational spectroscopy / H.S. Silva, P.B. Miranda // Journal of Physical Chemistry B. – 2009. – V.30 (113). – P. 10068–10071.

89. Wang, J. A strong bio-inspired layered PNIPAM-clay nanocomposite hydrogel / J.
Wang, L. Lin, Q. Cheng, L. Jiang // Angewandte Chemie - International Edition. – 2012.
– V.19 (51). – P. 4676–4680.

90. Cheng, Q. Bioinspired layered materials with superior mechanical performance / Q. Cheng, L. Jiang, Z. Tang // Accounts of Chemical Research. – 2014. – V.4 (47). – P. 1256–1266.

91. Wan, S. Synergistic toughening of graphene oxide-molybdenum disulfidethermoplastic polyurethane ternary artificial nacre / S. Wan, Y. Li, J. Peng, H. Hu, Q. Cheng, L. Jiang // ACS Nano. -2015. - V.1 (9). -P.708-714.

92. Yao, H. Bin Gold nanoparticle functionalized artificial nacre: Facile in situ growth of nanoparticles on montmorillonite nanosheets, self-assembly, and their multiple properties / H. Bin Yao, L.B. Mao, Y.X. Yan, H.P. Cong, X. Lei, S.H. Yu // ACS Nano. – 2012. – V.9 (6). – P. 8250–8260.

93. Wang, J. Synergistic toughening of bioinspired poly(vinyl alcohol)-clay- nanofibrillar cellulose artificial nacre / J. Wang, Q. Cheng, L. Lin, L. Jiang // ACS Nano. – 2014. – V.3 (8). – P. 2739–2745.

94. Cui, W. A strong integrated strength and toughness artificial nacre based on dopamine cross-linked graphene oxide / W. Cui, M. Li, J. Liu, B. Wang, C. Zhang, L. Jiang, Q. Cheng // ACS Nano. – 2014. – V.9 (8). – P. 9511–9517.

95. Xu, A.-W. Biomimetic mineralization / A.-W. Xu, Y. Ma, H. Cölfen // Journal of Materials Chemistry. – 2007. – V.5 (17). – P. 415–449.

96. Yao, H.-B. Direct fabrication of photoconductive patterns on LBL assembled graphene oxide/PDDA/titania hybrid films by photothermal and photocatalytic reduction / H.-B. Yao, L.-H. Wu, C.-H. Cui, H.-Y. Fang, S.-H. Yu // Journal of Materials Chemistry.

– 2010. – V.25 (20). – P. 5190.

97. Yan, L. Self-Assembled Monolayers (SAMs) and Synthesis of Planar Micro- and Nanostructures / L. Yan, W.T.S. Huck, G.M. Whitesides // Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews. – 2004. – V.2 (44). – P. 175–206.

98. Nudelman, F. Spiers Memorial Lecture : Lessons from biomineralization: comparing the growth strategies of mollusc shell prismatic and nacreous layers in Atrina rigida / F. Nudelman, H.H. Chen, H.A. Goldberg, S. Weiner, L. Addadi // Faraday Discussions. -2007. - (136). - P. 9.

99. Patel, I.F. Naturally inspired polyelectrolyte multilayer composite films synthesised through layer-by-layer assembly and chemically infiltrated with CaCO 3 / I.F. Patel, M. V. Kiryukhin, N.L. Yakovlev, H.S. Gupta, G.B. Sukhorukov // Journal of Materials Chemistry B. – 2015. – V.24 (3). – P. 4821–4830.

100. Addadi, L. Biomineralization: mineral formation by organisms / L. Addadi, S. Weiner // Physica Scripta. – 2014. – V.9 (89). – P. 098003.

101. Vidavsky, N. Initial stages of calcium uptake and mineral deposition in sea urchin embryos / N. Vidavsky, S. Addadi, J. Mahamid, E. Shimoni, D. Ben-Ezra, M. Shpigel, S. Weiner, L. Addadi // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2014. – V.1 (111). – P. 39–44.

102. Seidl, B. Ultrastructure and mineral distribution in the tergite cuticle of the beach isopod Tylos europaeus Arcangeli, 1938 / B. Seidl, K. Huemer, F. Neues, S. Hild, M. Epple, A. Ziegler // Journal of Structural Biology. – 2011. – V.3 (174). – P. 512–526.

103. Yao, H. Bin Artificial nacre-like bionanocomposite films from the self-assembly of chitosan-montmorillonite hybrid building blocks / H. Bin Yao, Z.H. Tan, H.Y. Fang, S.H. Yu // Angewandte Chemie - International Edition. -2010. - V.52 (49). -P. 10127–10131.

104. Kato, T. Layered Thin-Film Composite Consisting of Polymers and Calcium Carbonate: A Novel Organic/Inorganic Material with an Organized Structure / T. Kato,

T. Suzuki, T. Irie // Chemistry Letters. – 2000. – V.2. – P. 186–187.

105. Hosoda, N. Template effect of crystalline poly(vinyl alcohol) for selective formation of aragonite and vaterite CaCO3 thin films / N. Hosoda, A. Sugawara, T. Kato // Macromolecules. – 2003. – V.17 (36). – P. 6449–6452.

106. Nuutila, J. Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells / J. Nuutila, E.-M. Lilius // Cytometry Part A. – 2005. – V.2 (65A). – P. 93–102.

107. Ермаков, А.В. Перспективы развития биоподобных гибридных материалов на основе метода полиионной сборки / А.В. Ермаков, С.Б. Вениг // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. – 2018. – V.4 (18). – Р. 383–389.

108. Shenoy, D.B. Layer-by-Layer Engineering of Biocompatible, Decomposable Core–Shell Structures / D.B. Shenoy, A.A. Antipov, G.B. Sukhorukov, H. Möhwald // Biomacromolecules. – 2003. – V.2 (4). – P. 265–272.

109. Krasemann, L. Composite membranes with ultrathin separation layer prepared by self-assembly of polyelectrolytes / L. Krasemann, B. Tieke // Materials Science and Engineering: C. – 1999. – (8–9). – P. 513–518.

110. Ландау, Л.Д. Теоретическая физика. В 10-ти т. Т. VII. Теория упругости / Л.Д. Ландау, Е.М. Лифшиц. – 4-е изд., испр. и доп. – М.: Наука, 1987. – 248 с.

111. Knops, R.J. Theory of Elastic Stability / R.J. Knops. – Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1973. – 302 p.

112. Caruso, F. Characterization of Polyelectrolyte–Protein Multilayer Films by Atomic Force Microscopy, Scanning Electron Microscopy, and Fourier Transform Infrared Reflection–Absorption Spectroscopy / F. Caruso, D.N. Furlong, K. Ariga, I. Ichinose, T. Kunitake // Langmuir. – 1998. – V.16 (14). – P. 4559–4565.

113. Roca-Cusachs, P. Stability of Microfabricated High Aspect Ratio Structures in

Poly(dimethylsiloxane) / P. Roca-Cusachs, F. Rico, E. Martínez, J. Toset, R. Farré, D. Navajas // Langmuir. – 2005. – V.12 (21). – P. 5542–5548.

114. Tanaka, T. Mechanism of Resist Pattern Collapse during Development Process / T. Tanaka, M. Morigami, N. Atoda // Japanese Journal of Applied Physics. – 1993. – V.12 (32). – P. 6059–6064.

115. Matsukuma, D. Adhesion of Two Physically Contacting Planar Substrates Coated with Layer-by-Layer Assembled Films / D. Matsukuma, T. Aoyagi, T. Serizawa // Langmuir. – 2009. – V.17 (25). – P. 9824–9830.

116. Wilson, E.B. Book Review: A Treatise on the Mathematical Theory of Elasticity /
E.B. Wilson // Bulletin of the American Mathematical Society. – 1928. – V.2 (34). – P.
242–244.

117. Vinogradova, O.I. Mechanical Behavior and Characterization of Microcapsules /
O.I. Vinogradova, O. V. Lebedeva, B.-S. Kim // Annual Review of Materials Research.
2006. – V.1 (36). – P. 143–178.

118. Kolesnikova, T.A. Nanocomposite microcontainers with high ultrasound sensitivity
/ T.A. Kolesnikova, D.A. Gorin, P. Fernandes, S. Kessel, G.B. Khomutov, A. Fery, D.G.
Shchukin, H. Möhwald // Advanced Functional Materials. – 2010. – V.7 (20). – P. 1189–
1195.

119. Gong, L. Optimizing the reinforcement of polymer-based nanocomposites by graphene / L. Gong, R.J. Young, I.A. Kinloch, I. Riaz, R. Jalil, K.S. Novoselov // ACS Nano. – 2012. – V.3 (6). – P. 2086–2095.

120. Dejeu, J. Study of film growth properties of self-assembled polyelectrolyte films of higher thickness: Reflectometric and focused ion beam analyses / J. Dejeu, F. Membrey, S. Diziain, C. Bainier, M. Spajer, D. Charraut, A. Foissy // Journal of Physical Chemistry C. – 2008. – V.28 (112). – P. 10531–10537.

121. Derocher, J.P. Layer-by-layer assembly of polyelectrolytes in nanofluidic devices /

J.P. Derocher, P. Mao, J. Han, M.F. Rubner, R.E. Cohen // Macromolecules. – 2010. – V.5 (43). – P. 2430–2437.

122. Sun, X. Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery / X. Sun, Z. Liu, K. Welsher, J.T. Robinson, A. Goodwin, S. Zaric, H. Dai // Nano Research. – 2008.
– V.3 (1). – P. 203–212.

123. Suk, J.W. Mechanical properties of monolayer graphene oxide / J.W. Suk, R.D. Piner, J. An, R.S. Ruoff // ACS Nano. – 2010. – V.11 (4). – P. 6557–6564.

124. Ermakov, A. Polyelectrolyte-Graphene Oxide Multilayer Composites for Array of Microchambers which are Mechanically Robust and Responsive to NIR Light / A. Ermakov, S.H. Lim, S. Gorelik, A.P. Kauling, R.V.B. de Oliveira, A.H. Castro Neto, E. Glukhovskoy, D.A. Gorin, G.B. Sukhorukov, M. V. Kiryukhin // Macromolecular Rapid Communications. – 2019. – V.5 (40). – P. 1700868.

125. Ermakov, A. V. Electrically Induced Opening of Composite PLA/SWCNT Microchambers for Implantable Drug Depot Systems / A. V. Ermakov, E. V. Lengert, M.S. Saveleva, G.B. Sukhorukov // Izvestiya of Saratov University. New series. Series: Physics. – 2020. – V.4 (20). – P. 311–314.

126. Ermakov, A. V. Site-specific release of reactive oxygen species from ordered arrays of microchambers based on polylactic acid and carbon nanodots / A. V. Ermakov, V.L. Kudryavtseva, P.A. Demina, R.A. Verkhovskii, J. Zhang, E. V. Lengert, A. V. Sapelkin, I.Y. Goryacheva, G.B. Sukhorukov // Journal of Materials Chemistry B. – 2020. – V.35 (8). – P. 7977–7986.

127. Ermakov, A. V. Composite multilayer films based on polyelectrolytes and in situ formed carbon nanostructures with enhanced photoluminescence and conductivity properties / A. V. Ermakov, E.S. Prikhozhdenko, P.A. Demina, I.A. Gorbachev, A.M. Vostrikova, A. V. Sapelkin, I.Y. Goryacheva, G.B. Sukhorukov // Journal of Applied Polymer Science. – 2019. – V.27 (136). – P. 47718.

128. Sindeeva, O.A. Carbon dot aggregates as an alternative to gold nanoparticles for the

laser-induced opening of microchamber arrays / O.A. Sindeeva, E.S. Prikhozhdenko, D.N. Bratashov, A.M. Vostrikova, V.S. Atkin, A. V. Ermakov, B.N. Khlebtsov, A. V. Sapelkin, I.Y. Goryacheva, G.B. Sukhorukov // Soft Matter. – 2018. – V.44 (14). – P. 9012–9019.

129. Ermakov, A. V. Influence of Heat Treatment on Loading of Polymeric Multilayer Microcapsules with Rhodamine B / A. V. Ermakov, O.A. Inozemtseva, D.A. Gorin, G.B.
Sukhorukov, S. Belyakov, M.N. Antipina // Macromolecular Rapid Communications. –
2019. – V.5 (40). – P. 1800200.

130. Lvov, Y. Assembly of Multicomponent Protein Films by Means of Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption / Y. Lvov, K. Ariga, T. Kunitake, I. Ichinose // Journal of the American Chemical Society. – 1995. – V.22 (117). – P. 6117–6123.

131. Kastl, L. Multiple Internalization Pathways of Polyelectrolyte Multilayer Capsules into Mammalian Cells / L. Kastl, D. Sasse, V. Wulf, R. Hartmann, J. Mircheski, C. Ranke, S. Carregal-Romero, J.A. Martínez-López, R. Fernández-Chacón, W.J. Parak, H.-P. Elsasser, P. Rivera_Gil // ACS Nano. – 2013. – V.8 (7). – P. 6605–6618.

132. Roos, W.P. DNA damage-induced cell death by apoptosis / W.P. Roos, B. Kaina // Trends in Molecular Medicine. – 2006. – V.9 (12). – P. 440–450.

133. Ott, M. Mitochondria, oxidative stress and cell death / M. Ott, V. Gogvadze, S. Orrenius, B. Zhivotovsky // Apoptosis. – 2007. – V.5 (12). – P. 913–922.

134. Zong, W.-X. Necrotic death as a cell fate / W.-X. Zong // Genes & Development. – 2006. – V.1 (20). – P. 1–15.

135. Khan, A.N. Radio frequency controlled wireless drug delivery devices / A.N. Khan,
A. Ermakov, G. Sukhorukov, Y. Hao // Applied Physics Reviews. – 2019. – V.4 (6). – P. 041301.

136. Kim, V.P. Planar nanosystems on the basis of complexes formed by amphiphilic polyamine, magnetite nanoparticles, and DNA molecules / V.P. Kim, A. V. Ermakov,

E.G. Glukhovskoy, A.A. Rakhnyanskaya, Y. V. Gulyaev, V.A. Cherepenin, I. V. Taranov, P.A. Kormakova, K. V. Potapenkov, N.N. Usmanov, A.M. Saletsky, Y.A. Koksharov, G.B. Khomutov // Nanotechnologies in Russia. – 2014. – V.5–6 (9). – P. 280–287.

137. Ермаков, А.В. Управление целостностью нанокомпозитных микроструктур на основе липидов, полимеров и неорганических наночастиц в электрическом поле / А.В. Ермаков, В.П. Ким, А.С. Чумаков, И.А. Горбачев, Д.А. Горин, А.А. Савонин, И.В. Видяшева, Г.Б. Хомутов // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика. – 2013. – V.2 (13). – Р. 57–61.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность:

- научному руководителю Венигу Сергею Борисовичу;

- профессору Глебу Борисовичу Сухорукову (Лондонский университет королевы Марии, Лондон, Великобритания) за многолетнее сотрудничество и проведение совместных исследований в коллаборации и предоставленное оборудование, а также за помощь в написании ряда проектов на соискание грантов Российского научного фонда и стипендии президента российской федерации для обучения за рубежом;

- сотруднице лаборатории «Дистанционно управляемых систем для тераностики» ОНИ НСиБС (Саратовский государственный университет) Ленгерт Екатерине Владимировне за плодотворное и многолетнее сотрудничество, обсуждение результатов и мотивацию в работе;

- сотрудникам Института исследования и инженерии материалов (Сингапур) Марии Антипиной и Максиму Кирюхину за помощь в написании проекта на соискание стипендии правительства Сингапура (ARAP) и проведение совместных исследований;

- профессору Сколковского института науки и технологий Горину Дмитрию Александровичу за помощь в работе и плодотворное сотрудничество;

коллективу лаборатории «Дистанционно управляемых систем для тераностики»
 ОНИ НСиБС (Саратовский государственный университет) за помощь в проведении экспериментов.