

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра материаловедения,
технологии и управления качеством

**КАПСУЛЯЦИЯ МОДЕЛЬНОГО БЕЛКА В СУБМИКРОННЫЕ
ОБОЛОЧКИ НА ОСНОВЕ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента 4 курса 421 группы

направления 22.03.01 «Материаловедение и технологии материалов»

факультета нано – и биомедицинских технологий

Сулова Александра Сергеевича

Научный руководитель

доцент, к.х.н.

должность, уч. степень, уч. звание

подпись, дата

О. А. Иноземцева

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой

д.ф.–м.н., профессор

должность, уч. степень, уч. звание

подпись, дата

С. Б. Вениг

инициалы, фамилия

Саратов 2018

Введение. Одним из интенсивно развивающихся направлений современных нанотехнологий является разработка новых материалов биомедицинского назначения, в частности в области средств инкапсулирования и направленной доставки фармакологических веществ [1, 2].

Капсулы на основе диоксида кремния привлекательны в качестве средств доставки благодаря их химической инертности, биосовместимости, биоразлагаемости, а также возможности биофункционализации поверхности [3]. В качестве темплатов для формирования оболочек на основе диоксида кремния были использованы пористые частицы карбоната кальция (ватерит), которые могут быть эффективно загружены биологически активными веществами, а покрытие диоксидом кремния позволяет обеспечить долгосрочное сохранение биоэффективности инкапсулированного материала [4]. До недавнего времени, основные исследования велись с частицами микронных размеров, так как изготовление наноконтейнеров на основе карбоната кальция достаточно проблематично в силу их нестабильности, склонности к агрегации и перекристаллизации в стабильный кальцит [5]. Однако, для большинства *in vivo* применений важно, чтобы размер используемых средств доставки лежал в субмикронном диапазоне.

В соответствии с вышесказанным, целью данной дипломной работы являлась разработка эффективного метода получения полых микросфер (0,4 – 0,8 мкм) на основе диоксида кремния с включенными в них биологически активными молекулами.

Для достижения поставленной цели необходимо выполнить следующие задачи:

1. Проведение анализа современной литературы, посвященной синтезу, свойствам и применению частиц карбоната кальция, в частности ватерита;
2. Синтез и характеристика полученных частиц ватерита с использованием сканирующей электронной микроскопии в качестве контрольного метода;

3. Проведение дисперсионного анализа частиц ватерита на основе СЭМ микрофотографий образцов с помощью программного пакета ImageJ;
4. Капсуляция модельного флуоресцентного белка в частицы ватерита;
5. Разработка методики формирования оболочки диоксида кремния на поверхности частиц карбоната кальция и анализ полученных результатов
6. Характеризация полученных капсул с использованием конфокальной флуоресцентной сканирующей микроскопии.

Дипломная работа занимает 40 страницы, имеет 27 рисунков. Обзор составлен по 39 информационным источникам.

Во введение рассматривается актуальность работы, устанавливается цель и выдвигаются задачи для достижения поставленной цели.

В первом разделе описывается синтез сферических микрочастиц карбоната кальция. Был рассмотрен теоретический материал по данному вопросу. Рассмотрены основные методики и алгоритмы синтеза микрочастиц карбоната кальция. Приведены микрофотографии получаемых образцов.

Второй раздел представляет собой описание золь-гель метода и состоит из следующих подразделов: химическое обоснование золь-гель метода, кислый и щелочной гидролиз ТЭОС. В данном разделе рассмотрены основные методики и алгоритмы создания оболочек на основе диоксида кремния. Приведены микрофотографии получаемых образцов.

Третий раздел описывает синтез сферических субмикронных частиц карбоната кальция, их дальнейшее использование в качестве темплатов. Данный раздел состоит из нескольких подразделов: материалы и оборудование, используемые в эксперименте, получение субмикронных частиц карбоната кальция, капсуляция модельного белка, получение субмикронных капсул на основе диоксида кремния и методы исследования свойств полученных капсул.

В разделе проанализирован размер полученных субмикронных частиц. Результатом анализа являются данные, приведенные как гистограммы распределения частиц по размерам. Описывается капсуляция модельного вещества на поверхности частиц карбоната кальция, и дальнейшее

использование их как темпранты для нанесения оболочек на основе диоксида кремния.

В четвертом разделе представлены обсуждения полученных результатов. Представлено описание исследования влияния концентрации кремнийсодержащего прекурсора на структурно – поверхностные характеристики оболочек на основе диоксида кремния.

Основное содержание работы

Получение сферических микрочастиц карбоната кальция. В природе карбонат кальция встречается в виде трех полиморфных модификаций: кальцита, арагонита, ватерита. Термодинамическая стабильность данных форм уменьшается в ряду от кальцита к ватериту [6]. Даже не смотря на то, что ватерит является наименее стабильной разновидностью карбоната кальция, исследователи со всего мира заинтересованы его свойствами. Огромные возможности открываются при использовании CaCO_3 в качестве композитов для восстановления и роста костной ткани. Сферические частицы карбоната кальция (ватерит) также могут использоваться в качестве универсальной нано – или микронной системы доставки лекарственного средства вследствие биосовместимости, высокой грузочной емкости и способности сохранять свойства биологически активных соединений. Одной из главных проблем является нахождение условий синтеза кристаллов ватерита, а затем, их стабилизация для предотвращения их быстрой (порядка 20 часов) перекристаллизации в термодинамически более стабильный кальцит [7].

Золь – гель метод. Золь – гель процесс – это технология, включающая в себя получение золя с последующим переводом его в гель, то есть в коллоидную систему, представляющую собой жидкую дисперсионную среду, заключенную в пространственную сетку, образованную соединившимися частицами дисперсной фазы [8].

Можно проиллюстрировать процессы, происходящие в золь – гель системе, с помощью элементарной схемы представленной на рисунке 5.

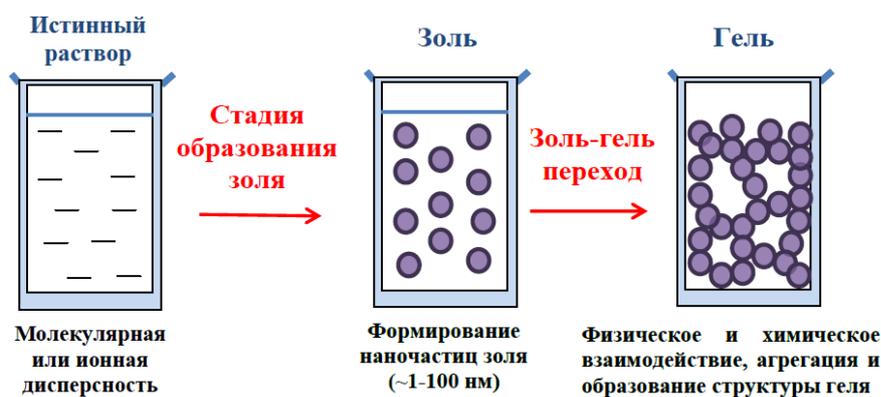


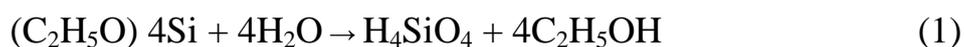
Рисунок 5 – Схема перехода истинного раствора в золь и далее в гель [8]

Классическими процессами, лежащими в основе золь – гель синтеза, являются процессы гидролиза алкоксидов кремния. Тетраэтоксисилан (ТЭОС) – сложный эфир ортокремниевой кислоты и этилового спирта с формулой $(C_2H_5O)_4Si$, является классическим прекурсором для формирования диоксида кремния.

Химическое обоснование золь – гель метода. В основе золь – гель процессов, которые протекают в полимерных золях, синтезируемых из алкоксидных соединений, лежит реакция гидролитической поликонденсации.

При гидролизе алкоксидов кремния, и в частности $Si(OEt)_4$, расщепляются связи $Si - OR$ с образованием силанолов $Si - OH$, которые очень неустойчивы и конденсируются с образованием силоксановых связей $Si - O - Si$, являющихся основным структурным элементом полисилоксанов, формирующих сетку неорганического полимера.

В предельном случае, если предположить, что реакция гидролиза ТЭОС идет до конца, ее можно представить в следующем виде, представленном формулой 1.



Кислый и щелочной гидролиз ТЭОС. Процесс гидролиза ТЭОС, в зависимости от вида катализатора, может быть представлен в кислой и щелочной среде. Преимущества диоксида кремния: биосовместимость и биodeградируемость, способность удерживать низкомолекулярные вещества внутри капсул, возможность биофункционализации поверхности. Диоксид кремния

не является источником питания для микроорганизмов, он не токсичен и биологически инертен. К тому же, капсулированные ферменты и клетки сохраняют свою биологическую активность. В зависимости от степени пористости, аморфный диоксид кремния может быть загружен активными молекулами различными подходами. Высвобождение лекарственных препаратов может быть достигнуто через поры диоксида кремния путем применения внешнего воздействия, например, температуры, ультразвука или рН среды. Диоксид кремния может быть растворен в биологической среде при контролируемых условиях в щелочной среде [9]. В качестве темплатов для покрытия диоксидом кремния могут быть использованы пористые частицы карбоната кальция (ватерит), они могут быть загружены различными веществами и легко деградируют в мягких условиях [10]. Преимуществом использования CaCO_3 в качестве темплата по сравнению с другими темплатными частицами заключается в том, что нет необходимости использовать высокие температуры или иные жесткие условия, чтобы удалить внутреннее «ядро», поэтому капсула может быть загружена биологически активными молекулами [11]. Микрофотографии образцов, получаемых по методике представленной ранее, представлены на рисунке 11.

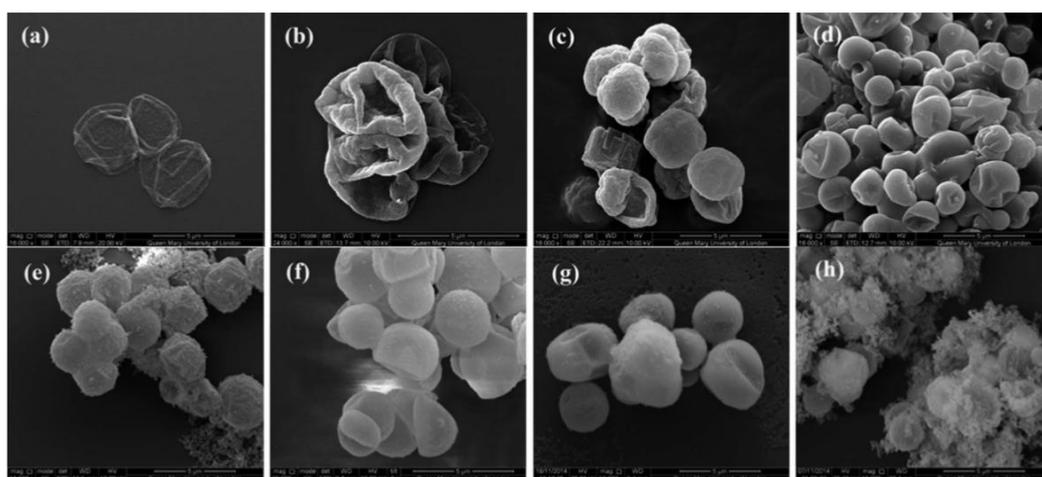


Рисунок 11 – СЭМ изображения композитных образцов, полученных при различных условиях реакции [11]: (а) образец А; (б) образец В; (с) образец С; (д) образец D; (е) образец Е; (е) образец F; (г) образец G; (з) образец Н

Экспериментальная часть. Данная часть дипломной работы проходила в три этапа. На первом этапе происходило формирование неорганического «ядра» – субмикронных пористых частиц ватерита (темплата) в растворе модельного белка. На втором этапе происходило формирование оболочки на основе диоксида кремния на поверхности темплата. На третьем этапе происходило растворение неорганического «ядра».

Материалы и оборудование, использованные в эксперименте. Хлорид кальция (CaCl_2), карбонат натрия (Na_2CO_3), глицерин ($\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$), деионизированная вода, этанол ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), изопропиловый спирт ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$), ацетон ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$), тетраэтоксисиликат (ТЭОС) ($\text{SiC}_8\text{H}_{20}\text{O}_4$), поливинилпирролидон (ПВП) ($\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}$)_n, водный раствор аммиака (NH_4OH), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$), 3-аминопропилтриэтоксилан (АПТЕС), триметилродаминизотиоцианат (ТРИТЦ), бычий сывороточный альбумин, маркированный триметилродаминизотиоцианатом (ТРИТЦ-БСА, 65 кДа). Вода, используемая во всех экспериментах, была подготовлена в трехэтапной системе очистки Millipore Milli-Q 185 Plus.

Получение субмикронных частиц карбоната кальция. Синтез частиц карбоната кальция осуществляли путем медленной кристаллизации в смеси вода – глицерин, в которой смешивали равные объемы эквимольных растворов хлорида кальция (CaCl_2) и карбоната натрия (Na_2CO_3), и перемешивали в течение 3 ч: После кристаллизации частицы промывали этиловым спиртом и сушили при 45°C .

С помощью сканирующего электронного микроскопа были получены микрофотографии частиц ватерита, представленные на рисунке 12.

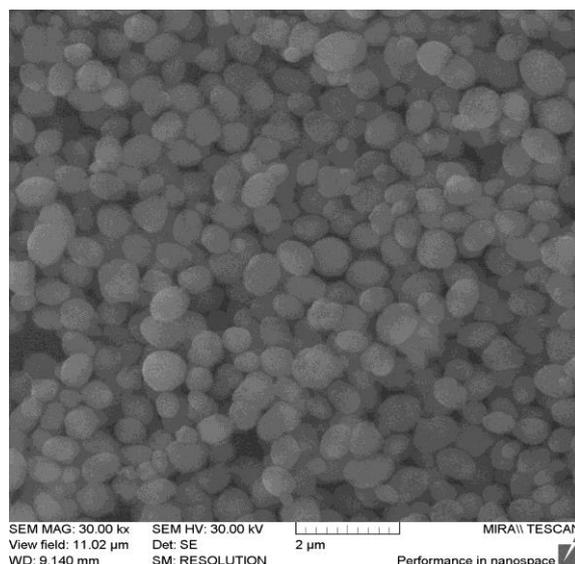


Рисунок 12 – Электронная микрофотография субмикронных частиц карбоната кальция

Из представленного изображения видно, что частицы имеют вытянутую форму вдоль одной из осей. Распределение по размерам частиц карбоната кальция исследовалось в программном пакете ImageJ так, чтобы получить как минимум 100 измерений на каждый образец.

Обработка данных с помощью программного пакета ImageJ. Программный пакет ImageJ позволяет обрабатывать фотографии, получаемые с помощью сканирующего электронного микроскопа. В данном разделе приведен пошаговый алгоритм работы с программой: от установки до получения результата. Представлен результат измерения полученных в ходе дипломной работы образцов в виде графического распределения частиц по размерам.

Капсуляция модельного белка. Инкапсулирование БСА, меченного ТРИТЦ, в объем пористой ватеритной матрицы осуществляли путем его соосаждения с соответствующими солями в процессе формирования частиц карбоната кальция в водно-глицериновой смеси. После промывки и высушивания полученные темплатные частицы были исследованы на конфокальном микроскопе Leica TCS SP8 X. Полученные изображения можно видеть на рисунке 18.

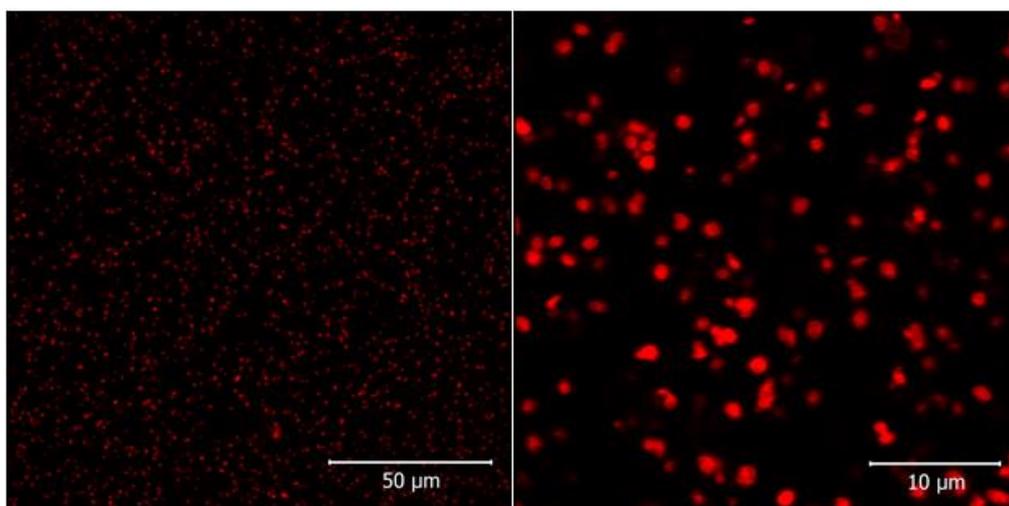


Рисунок 18 – Изображения субмикронных частиц карбоната кальция, с включенным в поры флуоресцентным белком, полученные с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии

Получение субмикронных капсул на основе диоксида кремния.

Для формирования оболочки диоксида кремния на поверхности частиц ватерита на их поверхность адсорбировали оболочку из полимера поливинилпирролидон (C_6H_9NO)_n (40 кДа), в которой происходило образование зародышевых наночастиц диоксида кремния и дальнейшее формирование сплошного слоя аморфного диоксида кремния. Силанизацию осуществляли в смеси изопропилового спирта ($CH_3CH(OH)CH_3$) и воды (9:1) в присутствии основания (водный раствор аммиака) в течение 20 ч при комнатной температуре. Химическая реакция силанизации темплатных частиц ватерита проходила с использованием золь – гель прекурсора тетраэтоксиртосиликата (ТЭОС). После завершения процесса формирования оболочки диоксида кремния, неорганические ядра (темплаты) растворяли путем комплексообразования ионов кальция с динатриевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЕДТА) в течение 24 ч. Представленная ранее методика образования субмикронных полых капсул на основе диоксида кремния проиллюстрирована на рисунке 19.

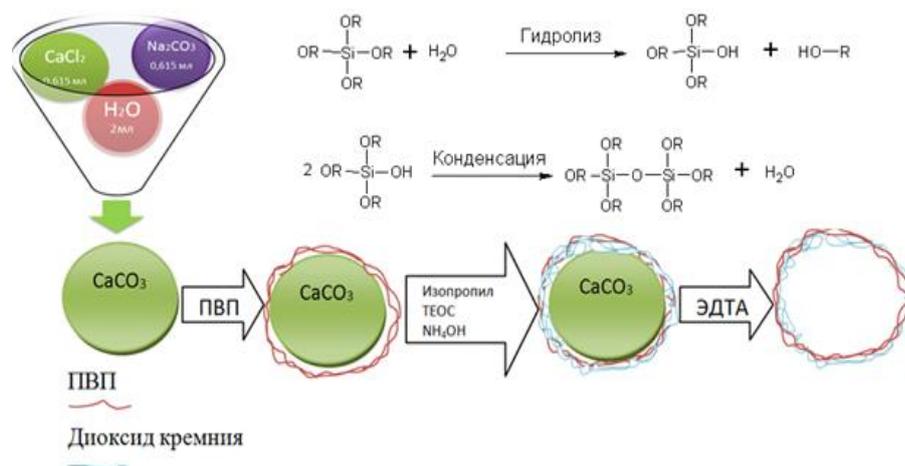


Рисунок 19 – Методика образования субмикронных полых капсул на основе диоксида кремния

Затем полученные частицы промывали водой и изучали методом СЭМ. Один из полученных образцов представлен на рисунке 20.

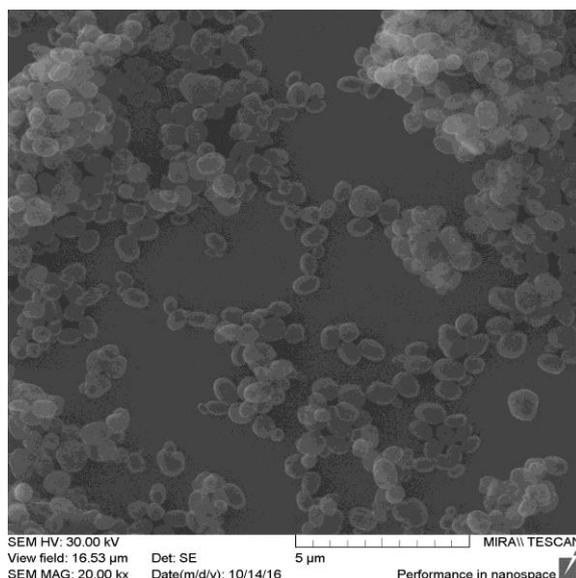


Рисунок 20 – Электронная микрофотография субмикронных капсул на основе диоксида кремния, полученных после растворения частиц ватерита

Методы исследования свойств микрокапсул. Для наблюдения за процессом формирования оболочек на основе диоксида кремния используют следующие методы: конфокальную флуоресцентную микроскопию. Для визуализации полученных микрокапсул применяют различные виды спектроскопических методов. Сканирующая электронная микроскопия позволяет получать изображение микрорельефа капсул, что дает возможность установить лишь размер капсул и предполагаемую форму оболочки.

Сканирующая электронная микроскопия. Сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) – микроскоп, использующий электроны для формирования изображения. С помощью данного микроскопа, возможно, получить информацию о химическом составе приповерхностной области и ее топографии. Сочетание более высокого разрешения, большей глубины фокусировки и простоты наблюдения образцов делает сканирующий электронный микроскоп одним из наиболее часто используемых инструментов в исследовательских областях [12].

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия является метод исследования, который позволяет наиболее достоверным определить формы оболочек микрокапсул непосредственно в растворе. В этом случае не требуется высушивать образцы, и форма капсул в растворе остается естественной. Однако существует необходимость крепления наблюдаемых капсул к предметному стеклу. Для этого поверхности стекла придают заряд, противоположный по знаку заряду последнего слоя оболочек капсул [13].

Обсуждение результатов. Было исследовано влияние условий формирования наноразмерных оболочек диоксида кремния (условия золь – гель синтеза, в частности влияние концентрации кремнийсодержащего прекурсора) на их структурно – поверхностные характеристики.

Было установлено, что использование поливинилпирролидона (ПВП) с различной молекулярной массой 10 кДа (ПВП 10) и 40 кДа (ПВП 40) не оказывало существенного влияния на морфологию полученных частиц диоксида кремния при одинаковой аликвоте кремнийсодержащего прекурсора (5 мкл). Вышесказанное можно увидеть на рисунках 22 и 23.



Рисунок 22 – ПВП 40 – 5

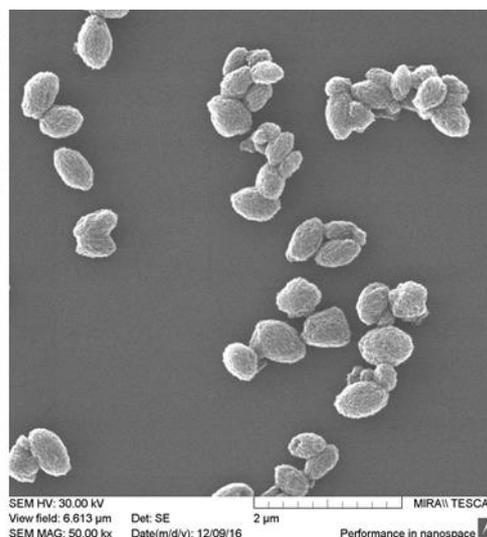


Рисунок 23 – ПВП 10 – 5

Однако, концентрация кремний – содержащего прекурсора оказалась критическим фактором, от которого зависела морфология получаемых частиц. Так, при минимальной аликвоте ТЭОС в 5 мкл на навеску темплатных частиц, поверхность частиц диоксида кремния повторяла рельеф исходных темплатов ватерита и само покрытие было неоднородным. При максимальной используемой аликвоте ТЭОС 10 мкл менялась сама форма частиц диоксида кремния, в частности, она становилась из вытянутой более сферической. Сами частицы приобретали способность сохранять форму при высушивании образца. Это демонстрируют рисунки 24 и 25.

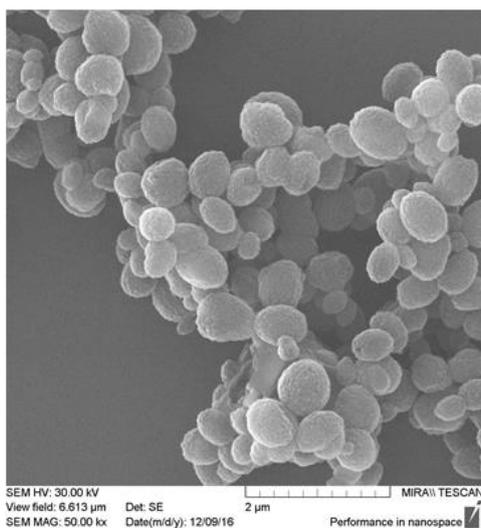


Рисунок 24 – ПВП 40 – 10



Рисунок 25 – ПВП 10 – 10

Промежуточная аликвота 7 мкл ТЭОС при использовании ПВП 10 кДа привела к формированию однородных, но «мягких» капсул, которые не сохраняют форму при высушивании по сравнению с капсулами, полученными при добавлении 10 мкл ТЭОС в аналогичных условиях. Данное сравнение можно увидеть на рисунках 26 и 27.

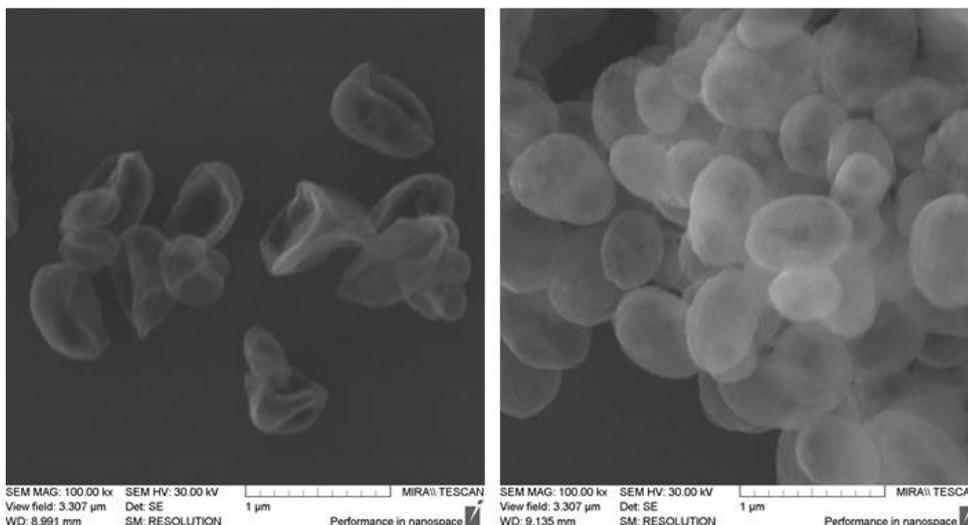


Рисунок 26 – ПВП 10 – 7 Рисунок 27 – ПВП 10 – 10

Таким образом, было продемонстрировано, что с увеличением аликвоты (5, 7 и 10 мкл) кремнийсодержащего прекурсора происходит постепенное утолщение оболочки диоксида кремния и позволяет получать так называемые «free – standing» капсулы, которые держат форму после высушивания.

Заключение. В последнее время внимание к различным системам доставки лекарств значительно возросло, благодаря развитию методов их синтеза и характеристики. В ходе выполнения дипломной работы были освоены методы формирования субмикронных частиц карбоната кальция и субмикронных капсул на основе диоксида кремния. Проведен обзор способов формирования композитных структур на основе диоксида кремния.

В ходе исследований достигнуты следующие результаты:

1. методом соосаждения получены в среде глицерина субмикронные частицы карбоната кальция (ватерита), которые в дальнейшем использованы в качестве шаблонов для формирования капсул на основе диоксида кремния;

2. с помощью программного пакета ImageJ, рассчитан средний размер полученных частиц, который составил 600 – 800 нм;
3. найдены оптимальные условия для формирования оболочек диоксида кремния путем конденсации кремнийсодержащего прекурсора (ТЭОС) на поверхности темплатов ватерита, содержащих инкапсулированные биологические активные молекулы (белок, маркированный флуоресцентным красителем);
4. исследовано влияние условий формирования наноразмерных оболочек диоксида кремния (условия золь-гель синтеза, в частности влияние концентрации кремнийсодержащего прекурсора) на морфологию с помощью сканирующей электронной микроскопии. Анализ факторов, позволил сделать вывод, что с увеличением аликвоты (5, 7 и 10 мкл) кремний – содержащего прекурсора происходит постепенное утолщение оболочки диоксида кремния.

Список использованных источников

- 1 Бердоносков, С. С. Промышленный синтез, свойства и практическое применение высокодисперсного карбоната кальция / С. С. Бердоносков, Д. Г. Бердоноскова, И. В. Знаменская // Химическая технология. 2002. Т. 8, № 1. С. 3–11.
- 2 Ochs, M. Synthesis and characterization of particles fabricated by layer-by-layer assembly / M. Ochs, S. Carregal-Romero, J. Rejman. Marburg: from the department of Physics of the Philipps University, 2014. P. 244.
- 3 Caruso, F. Formation of luminescent spherical core-shell particles by the consecutive adsorption of polyelectrolyte and CdTe(S) nanocrystals on latex colloids / F. Caruso, R. ACaruso, H. Möhwald // Journal: Science 2000. V. 282, № 2. P. 39–44.
- 4 Kazakova, L. I. Co – encapsulation of enzyme and sensitive dye as a tool for fabrication of microcapsule based sensor for urea measuring / L. I. Kazakova, G. B. Sukhorukov // Journal: Phys. Chem. 2011. V.13, № 1. P. 1110–1123.

- 5 Wolf, G. Thermophysical Investigations of the Polymorphous Phases of Calcium Carbonate / G. Wolf, C. Gunther // Journal of thermal Analysis and Calorimetry. 2001. V. 65, № 1. P. 687–698.
- 6 Алексеев, К. В. Наноразмерные системы доставки лекарственных веществ / К. В. Алексеев // Вестник новых медицинских технологий. 2009. Т. 16, № 2. С. 17–20.
- 7 Parakhonskiy, B. V. Sub-micrometer vaterite containers: synthesis, substance loading, and release / B.V. Parakhonskiy // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2011. V. 51, № 1. P. 1195 – 1199.
- 8 Мошников, В. А. Золь-гель технология микро– и нанокompозитов / В. А. Мошников, Ю. М. Таиров, Т. В. Хамова. М.: Изд-во «Лань», 2013. 304 с.
- 9 Wang, Y. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications / Y. Wang, Q. Zhao, N. Han // Journal: Chem. Soc. Rev. 2014. V. 41, № 2. P. 2590–2613.
- 10 Wu, S.H. Mesoporous silica nanoparticles as nanocarriers / S. H. Wu, Y. Hung, C. Y. Mou // Journal: Chem. Commun. 2011. V. 47, № 11. P. 9972–9983.
- 11 Ott, A. Light–Addressable and Degradable Silica Capsules for Delivery of Molecular Cargo to the Cytosol of Cells / A. Ott, X. Yu, R. Hartmann, J. Rejman, A. Schütz, M. Ochs, W. J. Parak // Journal: Chemistry of materials. 2015. V. 27, № 4. P. 1929–1942.
- 12 Гоулдстейн, Дж. Растровая электронная микроскопия и рентгеновский микроанализ / Дж. Гоулдстейн, Д. Ньюбери, П. Эчлин, Д. Джой. М.: Мир, 1984. 303 с.
- 13 Corle, T. R. Confocal scanning optical microscopy and related imaging systems / T.R. Corle, K. A. Gordon. California: Stanford University, 1996. P. 355.