

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет
имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской
Федерации

На правах рукописи

Ленгерт Екатерина Владимировна

**Альгинатные микроконтейнеры, модифицированные серебряными
наночастицами: получение, свойства и применение**

Специальность 1.4.4. – Физическая химия

Диссертация
на соискание ученой
степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
Кандидат физико-математических наук
Ермаков Алексей Вадимович

Саратов
2025

Работа выполнена в центральной научно-исследовательской лаборатории Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	38
2.1 Материалы.....	38
2.2 Методики формирования микроразмерных частиц карбоната кальция	39
2.3 Методика формирования субмикронных частиц карбоната кальция.....	39
2.4 Методики иммобилизации модельных соединений в мезопористые частицы карбоната кальция.	40
2.5 Синтез наночастиц магнетита.....	41
2.6 Методика создания полых гидрогелевых микроконтейнеров формируемые на ядрах ватерита	41
2.7 Методика создания полых гидрогелевых микроконтейнеров с наночастицами магнетита.....	42
2.7.1 Адсорбция магнетита.....	42
2.7.2 Соосаждение магнитных наночастиц в ядра CaCO_3	43
2.7.3 Получение полых гибридных микроконтейнеров	43
2.7.4 Количественное определение наночастиц магнетита в микроконтейнерах методом колориметрического титрования	44
2.7.5 Оценка стабильности микроконтейнеров.....	44
2.8 Методы исследования и характеристики образцов	45
2.8.1 Исследование воздействия ультразвуковой обработки	45

2.8.2 Исследования образцов методом сканирующей электронной микроскопией	45
2.8.3 Определение размера частиц по изображениям, полученным методом сканирующей электронной микроскопии.....	45
2.8.4 Исследование образцов методом просвечивающей электронной микроскопией	46
2.8.5 Определение положения наночастиц серебра по микроизображениям, полученным методом просвечивающей электронной микроскопией	46
2.8.6 Исследование образцов методом флуоресцентной микроскопии	47
2.8.7 Исследование образцов методом гигантского комбинационного рассеяния	47
2.8.8 Определение эффективности загрузки красителем образцов с помощью метода с помощью метода спектрофотометрии	48
2.8.9 Высвобождение полезной нагрузки с помощью маломощной ультразвуковой (разрешенной для медицинского применения) стимуляции	49
ГЛАВА 3. Создание, загрузка и характеристика микроразмерных и субмикронных гибридных контейнеров.....	50
ГЛАВА 4. Исследование влияния состава и структуры оболочки микроконтейнеров на десорбцию инкапсулированных молекул конъюгата ТРИЦ-БСА с помощью маломощной ультразвуковой стимуляции.	70
ГЛАВА 5. Исследование влияния состава и структуры альгинатных микроконтейнеров на кинетику высвобождения загруженного соединения под действием лазерного излучения в условиях <i>in vivo</i> на примере многоклеточных живых организмов (<i>C. elegans</i>).	74
1.1 Приготовление культуры <i>C. elegans</i>	74
1.2 Подготовка к интернализации гибридных микроконтейнеров <i>in vivo</i> нематодами <i>C.elegans</i>	75

1.3 Лазерно-индуцированное высвобождение красителя, исследования флуоресцентной микроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния	76
1.4 Изучение влияния лазерного облучения на процессы десорбции инкапсулированного в микроконтейнеры конъюгата ТРИЦ-БСА <i>in vitro</i>	77
1.5 Изучение влияния лазерного облучения на процессы высвобождения, инкапсулированного в микроконтейнеры вещества <i>in vivo</i>	79
ВЫВОДЫ	88
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	91
БЛАГОДАРНОСТИ	111

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- МНЧ – магнитные наночастицы;
- СЭМ – сканирующая электронная микроскопия;
- ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия;
- СПЭМ – сканирующая просвечивающая электронная микроскопия;
- BF (Bright Field) – это светлпольный режим в СПЭМ;
- EDXS – энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии;
- PBS – фосфатно-солевой буфер;
- DPBS – фосфатно-солевой буфер Дульбекко;
- DMEM – среда Игла, модифицированная по Дульбекко;
- NaCl – хлорид натрия;
- ГКР – гигантское комбинационное рассеяние;
- ТРИЦ-БСА – это флуоресцентный конъюгат бычьего сывороточного альбумина (BSA), меченный тетраметилродамин-изотиоцианатом (TRITC). TRITC ковалентно присоединяется к аминок группам остаточных лизинов BSA через изотиоцианатную группу, в результате чего получается стабильная красная флуоресцентная метка;
- $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – дигидрат хлорида кальция $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$;
- Na_2CO_3 – карбонат натрия;
- $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$ – этиленгликоль;
- $(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6)_n$ – альгинат Натрия;
- AgNO_3 – нитрат серебра;
- $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ – аскорбиновая кислота;
- H_2SO_4 – серная кислота;
- CaCO_3 – карбонат кальция, ватерит;
- C_0 – начальная концентрация;
- C_t – концентрация в момент времени t ;
- k – константа скорости десорбции;
- t – время;

SSEF – коэффициент усиления субстрата комбинационного рассеяния;

АЛГ – слои альгината натрия на поверхности микроконтейнера;

PDI – индекс полидисперсности;

E. coli OP50 – штамм бактерий *Escherichia coli*, который используется в качестве источника пищи для нематод (*C. elegans*) в лабораторных условиях.

C. elegans (*Caenorhabditis elegans*) – свободноживущая почвенная нематода длиной около 1 мм, широко используется как модельный организм в исследованиях.

ВВЕДЕНИЕ

Использование синтетических нано- и микроматериалов в биомедицине позволяет решать многофакторные задачи в условиях организма с целью изменения и контроля фармакокинетики терапевтических препаратов. Современный прогресс в научных исследованиях обеспечивает более глубокое понимание поведения наноматериалов во времени, что ставит перед учеными новые задачи и требования к материалам, усложняя их свойства и функции в контексте целевой доставки и терапии. Одной из ключевых проблем систем микроинкапсулирования является низкая специфичность их действия, решение которой требует создания многофункциональных микрообъектов.

В настоящее время для решения этой проблемы предлагается использование комбинации нескольких принципов в рамках концепции тераностики, что включает высвобождение инкапсулированных веществ в ответ на эндогенные или экзогенные триггеры, специфическое нацеливание на патогенные цели в организме, анализ состава химического микроокружения на границе раздела с микроконтейнером для диагностики, а также биовизуализацию.

Для создания многокомпонентных мультифункциональных гибридных наноматериалов, отвечающих требованиям биомедицины, активно применяются методы физической химии, которые позволяют точно контролировать состав, структуру и свойства наноматериалов. В этом контексте темплатный метод представляется как перспективная стратегия получения нано- и микроматериалов, основанная на использовании временных шаблонных частиц, которые, обладая заданной формой и структурой, служат основой для формирования целевых материалов; после завершения процесса синтеза шаблоны подлежат удалению, что позволяет получить функциональные структуры с высокой степенью контролируемости морфологии и размерного распределения, что особенно важно для применения в области направленной доставки лекарственных средств. Это предполагает широкий круг задач, включая установление зависимости свойств нанокompозитных материалов от их состава и влияние условий формирования

микроконтейнеров на их характеристики. Одним из перспективных материалов для создания биосовместимых контейнеров являются нанокомпозиты, основанные на гибридных органических и неорганических материалах, состоящие из гидрогеля и неорганических наполнителей, включая наночастицы. Эти материалы обладают уникальными физико-химическими свойствами, которые могут быть адаптированы для решения конкретных терапевтических задач. Так, использование наночастиц с магнитными или оптическими свойствами может значительно улучшить отслеживание и контроль процессов доставки и высвобождения лекарств в организме.

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

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

Для достижения этой цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Разработать способ получения микроконтейнеров методом темплатного синтеза, предусматривающего одновременное протекание двух физико-химических процессов: растворение частиц ватерита и формирование активных центров в полимерной матрице; исследовать термодинамические и кинетические аспекты процесса формирования структур «ядро-оболочка».

2. Исследовать возможность сорбции модельного белкового соединения (бычьего сывороточного альбумина, конъюгированного с флуоресцентным красителем) и магнитных наночастиц в оболочки гибридных микроконтейнеров;

проанализировать влияние размера ядер ватерита и структуры оболочек микроконтейнеров на эффективность сорбции обоих компонентов.

3. Найти подход к дистанционному управлению целостностью микроконтейнеров посредством внешних воздействий, таких как, ультразвук и лазерное излучение; исследовать связь между составом оболочки и процессом десорбции иммобилизованных модельных веществ из оболочек гибридных микроконтейнеров при воздействии ультразвукового излучения и лазерного излучения ИК-диапазона. Оценить влияние состава оболочек микроконтейнеров и условий воздействия на кинетику десорбции при внешних воздействиях.

4. Изучить влияние наночастиц серебра в составе альгинатной матрицы на эффект комбинационного рассеяния света на поверхности микроконтейнеров для дальнейшего их применения в анализе химического состава микроокружения на границе раздела с микроконтейнером.

Научная новизна работы.

- Систематически исследовано формирование гибридных альгинатных микроконтейнеров и влияние внешних полей на десорбцию модельного соединения для дистанционного управления ими, что открывает возможности создания молекулярных технологий, ориентированных на применение в таких приоритетных направлениях, как биология, медицина и фармакология.

- Оригинальным темплатным методом получены гибридные микроконтейнеры, сочетающие биосовместимую альгинатную матрицу и неорганические наночастицы серебра. Использование высокопористых частиц карбоната кальция в качестве шаблона позволило получить материалы с

контролируемой морфологией и размерами, стабильные в лиофилизированном состоянии.

- Установлена зависимость между условиями синтеза и распределением магнитных наночастиц в многослойных гибридных микроконтейнерах, что позволило создавать микроконтейнеры с настраиваемыми характеристиками.

- Установлена зависимость между количеством адсорбированных ионов серебра на шаблонных ядрах ватерита и структурой оболочек альгинатных микроконтейнеров, включая типичные дефекты двойников наночастиц серебра и изменение морфологии поверхности контейнеров.

- Установлена зависимость между параметрами внешних воздействий (ультразвуковое и лазерное излучение) на гибридные микроконтейнеры, составом оболочки и кинетикой десорбции модельных веществ. Установлено, что синтезированные наночастицы серебра *in situ* в составе альгинатной матрицы оболочек микроконтейнеров позволяют индуцировать десорбцию высокомолекулярного соединения из альгинатных микроконтейнеров посредством воздействия ИК лазерного излучения, в том числе в условиях *in vivo* без деструктивного влияния на биологические объекты (*C. elegans*).

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

Практическая значимость исследования:

Предложены способы получения гибридных микроконтейнеров, альгинатная оболочка которых модифицирована наночастицами серебра *in situ*. На примере бычьего сывороточного альбумина показано, что модифицированные

микроконтейнеры, состоящие из альгината натрия и наночастиц серебра, позволяют эффективно инкапсулировать белки. Продемонстрирована возможность сорбции магнитных наночастиц микроконтейнерами, что позволяет создавать структуры с контролируемым содержанием магнетита.

Установлены условия получения и состав оболочек альгинатных контейнеров, при которых внешние поля (маломощная ультразвуковая стимуляции и инфракрасное излучение в первом биологическом окне прозрачности) индуцируют десорбцию модельных соединений из микроконтейнеров и позволяют контролируемо их высвобождать, что дает потенциальную возможность их применения в качестве средств доставки лекарств с профилем высвобождения, контролируемым посредством внешних стимулов.

Полученный эффект усиления комбинационного рассеяния света на поверхности гибридных микроконтейнеров на основе альгината и наночастиц серебра позволяет использовать полученные микроконтейнеры для детектирования веществ внешней среды и получения информации о составе внешней среды в рамках концепции тераностики.

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

На защиту автор выносит следующие положения:

1. Растворение шаблонных частиц карбоната кальция аскорбиновой кислотой, покрытых альгинатом натрия в присутствии раствора нитрата серебра, приводит к гелеобразованию альгинатной оболочки с одновременным зародышеобразованием наночастиц серебра в альгинатной матрице.

2. Синтез наночастиц серебра из ионов непосредственно в альгинатной оболочке способствует усилению эффекта комбинационного рассеяния света на поверхности гибридных альгинатных микроконтейнеров.

3. Воздействие ультразвука с частотой 35 кГц и плотностью мощности выше 0,64 Вт/см² на гибридные микроконтейнеры инициирует появление дефектов оболочки, что увеличивает десорбцию инкапсулированного в них модельного конъюгата ТРИЦ-БСА.

4. Воздействие лазерного излучения с длиной волны 785 нм и мощностью лазера 15 мВт на альгинатные микроконтейнеры, модифицированные наночастицами серебра, в условиях *in vivo* способствует увеличению десорбции инкапсулированного в них модельного конъюгата ТРИЦ-БСА через оболочку контейнера.

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

Публикации. По теме диссертации опубликовано 17 публикаций, включая 9 статей в журналах, входящих в перечень ВАК и библиографические базы данных Web of Science и Scopus.

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

Финансовая поддержка. Работы осуществлялась в рамках следующих проектов:

Правительства Российской Федерации (Грант № 14. Z50.31.0004 для поддержки реализуемых научно-исследовательских проектов под руководством ведущих ученых российских институтов и российские вузы) и Российского фонда фундаментальных исследований (НИЦ РФФИ № 15-29-01172 офи_м). Стипендии президента РФ обучения за рубежом в 2016/2017 году. Гос. задания ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского» Минздрава России (проект № 121032500024-2). Российского фонда фундаментальных исследований по научному проекту № 17-33-50080. Минобрнауки РФ в рамках государственного задания (проект № ФССР-2020-0002). Грант российского научного фонда № 22-73-10032 «Лекарственные носители с обратной рН-чувствительностью и способностью к быстрому высвобождению как альтернативный путь доставки лекарств».

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Разработка микро- и наноструктур для тераностики с высоким пространственным разрешением является актуальной задачей современной физикой химии, поскольку такие системы обеспечивают высокочувствительный анализ микроокружения, мониторинг и управление химическими и физико-химическими процессами на микро- и наноуровне. Такие системы открывают новые возможности для создания функциональных платформ, объединяющих функции биосенсора и лекарственного носителя, что важно для исследований массопереноса, каталитических процессов, сорбции и молекулярного распознавания в сложных гетерогенных системах. В настоящее время наблюдается ограниченное число структур, способных одновременно выполнять функции доставки лекарственных веществ и аналитических задач. Среди наиболее перспективных решений выделяются гибридные гидрогелевые системы, эффективность которых подтверждена в различных приложениях, таких как адресная доставка фармацевтических агентов, биосенсоры, перевязочные материалы, сорбенты и антимикробные структуры. Одним из наиболее распространённых материалов являются гидрогели на основе альгината, обусловленные их биосовместимостью, доступностью и низкой токсичностью. Создание иерархических систем, включающих альгинатный полимер в качестве матрицы с равномерным распределением неорганических наночастиц, достигается за счет контроля физических и химических свойств альгината, поверхностной химии наночастиц, а также методов производства, основанных на внешних стимулах или самосборке. Так, системы для тераностики должны обеспечивать возможность инкапсуляции и высвобождения лекарственных препаратов [1,2], а также обладать соответствующими возможностями обнаружения биологических маркеров методом поверхностно-усиленной спектроскопии комбинационного рассеяния света [3,4]. В связи с этим модификация лекарственных носителей наночастицами серебра представляется одним из перспективных способов их функционализации для целей тераностики, позволяя изменять оптические свойства

микроконтейнеров [5,6], осуществлять обнаружение веществ с помощью поверхностно-усиленного комбинационного рассеяния [7–9], улучшать механические характеристики материала [10], а также повышать его чувствительность к ультразвуковому и лазерному воздействиям за счет управления плотностью оболочки [11,12]. Эти подходы позволяют разрабатывать функциональные наноматериалы с контролируемой структурой и свойствами, что является важным направлением в области физико-химических исследований и разработки новых материалов для медицинских и биотехнологических приложений.

Применение альгината в области биоматериалов

Альгинат — это анионный полимер, встречающийся в природе, обычно получаемый из бурых морских водорослей, который был тщательно исследован и использовался для многих биомедицинских применений благодаря своей биосовместимости, низкой токсичности, относительно низкой стоимости и мягкому гелеобразованию при добавлении двухвалентных катионов, таких как Ca^{2+} [13]. Альгинатные гидрогели можно получать различными методами сшивания, а их структурное сходство с внеклеточными матрицами живых тканей позволяет широко применять их различных целях, включая заживление ран, доставке биоактивных агентов, таких как небольшие химические препараты и белки, и при трансплантации клеток. Альгинатные раневые покрытия поддерживают физиологически влажную среду, минимизируют бактериальную инфекцию в месте раны и способствуют заживлению ран. Лекарственные молекулы, от небольших химических препаратов до макромолекулярных белков, могут высвобождаться из альгинатных гелей контролируемым образом в зависимости от типов сшивающих агентов и методов сшивания. Кроме того, альгинатные гели можно вводить перорально или вводить в организм минимально инвазивными способами, что позволяет широко применять их в фармацевтической сфере. Альгинатные гели также перспективны для

трансплантации клеток в тканевой инженерии. Тканевая инженерия направлена на обеспечение искусственных тканей и органов для пациентов, которые страдают от потери или отказа органа или ткани [14].

Структура и характеристика

Альгинат представляет собой целое семейство линейных сополимеров, содержащих блоки (1,4)-связанных остатков β -D-маннуроната (М) и α -L-гулуроната (Г). Блоки состоят из последовательных остатков Г (ГГГГГГ), последовательных остатков М (ММММММ) и чередующихся остатков М и Г (ГМГМГМ) (рисунок 1).

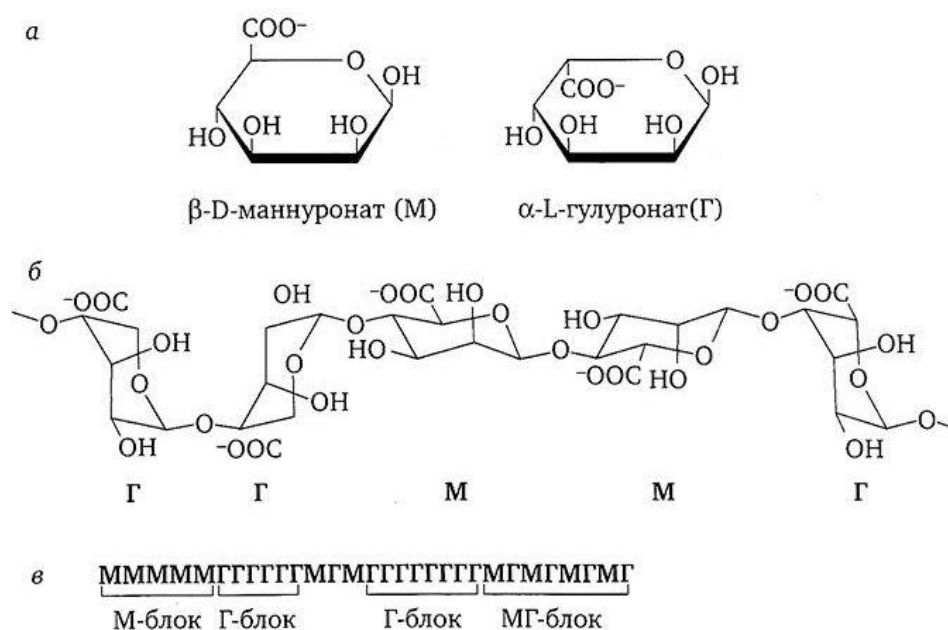


Рисунок 1 – Мономеры альгината (а); конформация цепи (б), распределение блоков альгината (в) [15].

Альгинаты, извлеченные из разных источников, различаются по содержанию М и Г блоков, а также по длине каждого блока, и в настоящее время производится более 200 различных альгинатов [15]. Содержание Г-блоков в стеблях *Laminaria*

hyperborean составляет 60%, а для других коммерчески доступных альгинатов находится в диапазоне 14,0–31,0% [15].

Согласно литературным данным только Г-блоки альгината участвуют в межмолекулярном сшивании с двухвалентными катионами (например, Ca^{2+}) для образования гидрогелей. Таким образом, состав (т. е. соотношение М/Г), последовательность, длина Г-блока и молекулярная масса являются критическими факторами, влияющими на физические свойства альгината и получаемых из него гидрогелей [16]. Механические свойства альгинатных гелей обычно улучшаются за счет увеличения длины Г-блока и молекулярной массы. Важно отметить, что различные источники альгината обеспечивают полимеры с различными химическими структурами (например, бактериальный альгинат, полученный из *Azotobacter*, имеет высокую концентрацию Г-блоков, а его гели имеют относительно высокую жесткость [13]). Физические свойства в значительной степени контролируют стабильность гелей, скорость высвобождения лекарственных средств из гелей, а также фенотип и функцию клеток, инкапсулированных в альгинатные гели.

Альгинат широко применяется в форме гидрогелей в различных областях биомедицины, включая заживление ран, доставку лекарственных средств и тканевую инженерию [17–20]. Гидрогели представляют собой трехмерные сшитые сети, состоящие из гидрофильных полимеров, обладающих высокой водопоглощающей способностью. Благодаря своей биосовместимости, гидрогели часто имитируют структурные компоненты внеклеточного матрикса, что способствует их успешной интеграции в организм и минимально инвазивному введению. Химическое и/или физическое сшивание гидрофильных полимеров [21] является основными методами формирования гидрогелей, позволяя регулировать их механические свойства, степень пористости и стабильность. Физико-химические характеристики гидрогелей существенно зависят от типа и плотности сшивания, а также от молекулярной массы и химического состава используемых полимеров [22,23].

- Ионная сшивка

Наиболее распространенным методом приготовления гидрогелей из водного раствора альгината является объединение раствора с ионными сшивающими агентами, такими как двухвалентные катионы (например, Ca^{2+}). Согласно литературным данным двухвалентные катионы связываются исключительно с гулуонатными блоками. Затем гулуонатные блоки одного полимера образуют соединения с гулуонатными блоками соседних полимерных цепей в так называемой модели сшивания по типу «яйцо-коробка», что приводит к образованию гелевой структурными блоками альгинатных цепей, поскольку структура гулуонатных блоков обеспечивает высокую степень координации двухвалентных ионов. Хлорид кальция (CaCl_2) является одним из наиболее часто используемых агентов для ионного сшивания альгината. Однако это обычно приводит к быстрому и плохо контролируемому гелеобразованию из-за его высокой растворимости в водных растворах. Одним из подходов к замедлению и контролю гелеобразования является использование буфера, содержащего фосфат (например, гексаметафосфат натрия), поскольку фосфатные группы в буфере конкурируют с карбоксилатными группами альгината в реакции с ионами кальция и замедляют гелеобразование. Сульфат кальция (CaSO_4) и карбонат кальция (CaCO_3) из-за их более низкой растворимости также могут замедлять скорость гелеобразования и увеличивать рабочее время для альгинатных гелей. Например, раствор альгината можно смешать с CaCO_3 , который не растворяется в воде при нейтральном pH. Затем к смеси альгината/ CaCO_3 добавляют глюконо- δ -лактон чтобы диссоциировать Ca^{2+} из CaCO_3 путем снижения pH. Высвобождающийся Ca^{2+} впоследствии инициирует гелеобразование альгинатного раствора более постепенным образом [24]. Скорость формирования геля играет важную роль в обеспечении его однородности и прочности при использовании двухвалентных катионов. Замедленное гелеобразование способствует созданию более равномерных структур и повышенной механической стабильности геля [25]. Температура гелеобразования также влияет на скорость гелеобразования и

результатирующие механические свойства гелей. При более низких температурах реакционная способность ионных сшивающих агентов (например, Ca^{2+}) снижается, и сшивание замедляется. Полученная сшитая сетчатая структура имеет больший порядок, что приводит к улучшенным механическим свойствам [26]. Кроме того, механические свойства ионно-сшитых альгинатных гелей могут значительно различаться в зависимости от химической структуры альгината. Например, гели, приготовленные из альгината с высоким содержанием остатков Г, демонстрируют более высокую жесткость, чем гели с низким количеством Г-остатков [27]. Одним из критических недостатков ионно-сшитых альгинатных гелей является ограниченная долгосрочная стабильность в физиологических условиях, поскольку эти гели могут растворяться из-за высвобождения двухвалентных ионов в окружающую среду из-за обменных реакций с одновалентными катионами. Эти особенности могут быть полезными или отрицательными (поскольку ионы кальция, высвобождаемые из геля, могут способствовать гемостазу, в то время как гель служит матрицей для агрегации тромбоцитов и эритроцитов [28]) в зависимости от ситуации, но желание избежать этих биологических реакций, наряду с более общими ограничениями ионно-сшитых гелей, привело к интересу к ковалентно-сшитым альгинатным гидрогелям.

- Ковалентная сшивка

Ковалентное сшивание широко исследовалось в попытке улучшить физические свойства гелей для многих применений, включая тканевую инженерию. Напряжение, приложенное к ионно-сшитому альгинатному гелю, ослабевает, поскольку поперечные связи диссоциируют и преобразуются в другом месте, и вода теряется из геля, что приводит к пластической деформации. Хотя миграция воды также происходит в ковалентно-сшитых гелях, что приводит к релаксации напряжения, неспособность диссоциировать и преобразовывать связи приводит к значительной упругой деформации. Ковалентное сшивание происходит между функциональными группами, присоединёнными к биополимерам, и обычно

требует применения катализаторов или инициаторов для образования ковалентных связей [29]. Однако ковалентные сшивающие реагенты могут быть токсичными, и непрореагировавшие химические вещества, возможно, придется тщательно удалить из гелей. Использование многофункциональных сшивающих молекул для образования гидрогелей обеспечивает более широкий диапазон и более жесткий контроль над скоростями деградации и механической жесткостью, чем бифункциональные сшивающие молекулы. Так, например, синтезировали два типа альгината: один с азидными группами (alginate-N₃), другой с BCN-группами (alginate-BCN). Смешивали растворы этих двух полимеров при комнатной температуре или 37°C, что приводило к образованию прочной ковалентной сети за счёт реакции SPAAC (азид-алкиновое циклоприсоединение, запускаемое напряжением). Полученные гидрогели были стабильны в физиологических условиях и не зависели от наличия ионов кальция (в отличие от классического ионного сшивания). В эти гидрогели инкапсулировали мезенхимальные стромальные клетки (hASCs) и показали, что более 90% клеток оставались живыми спустя 14 дней, а также сохранялась их способность к секреции противовоспалительных факторов [30]. Этот подход позволяет создавать альгинатные гидрогели с высокой стабильностью и биосовместимостью для длительной доставки клеток, что важно для клеточной терапии и тканевой инженерии. Недостатком является токсичность ковалентных сшивающих реагентов, что требует удаления непрореагировавших соединений из геля.

- Фотосшивание

Фотосшивание — метод создания гидрогелей *in situ* с помощью видимого и ультрафиолетового облучения. Фотосшивание может проводиться в мягких условиях реакции, даже при прямом контакте с лекарственными средствами и клетками, с соответствующими химическими инициаторами. Так, описан метод фотосшивания гидрогелей на основе полиэтиленгликоль диакрилата (PEGDA) с использованием нового водорастворимого фотосенсибилизатора (dye-A1). Этот

фотосенсибилизатор активируется видимым светом (LED@405 нм) или даже солнечным светом, что позволяет проводить реакцию при мягких условиях (комнатная температура, водная среда) и в присутствии клеток или лекарственных веществ, даже при очень низкой концентрации инициатора (0,01% по массе) достигается почти 100% конверсия двойных связей при облучении [31]. Гидрогели, полученные этим способом, пригодны для 3D- и 4D-печати, обладают обратимой формой памяти (меняют форму при смачивании и высушивании). Реакции фотосшивания обычно включают использование светосенсибилизатора или высвобождение кислоты, которая может быть вредна для организма. Однако, метод фотосшивания позволил проводить полимеризацию непосредственно в присутствии воды и биологических объектов, что критично для биомедицинских применений [31]. Для успешного фотосшивания требуется тщательно контролировать интенсивность света, время облучения и концентрацию фотоинициатора. Превышение оптимальных параметров может привести к повреждению клеток, снижению их жизнеспособности, а также к повреждению ДНК, особенно при использовании ультрафиолетового излучения (290–320 нм). Быстрое протекание фотосшивания и неравномерное распределение света могут приводить к формированию неоднородной структуры гидрогеля, особенно при значительных степенях фотосшивания. Это проявляется в виде зон с разной плотностью сшивки и, как следствие, разными механическими свойствами [32].

- Термическое гелеобразование

Термочувствительные гидрогели на сегодняшний день широко исследованы во многих приложениях по доставке лекарств из-за их регулируемых свойств набухания в ответ на изменения температуры, что приводит к модуляции высвобождения лекарства из гелей по требованию [33,34].

Гидрогели поли(N-изопропилакриламида) (PNIPAAm) являются наиболее широко используемыми термочувствительными гелями, и они претерпевают обратимый фазовый переход вблизи температуры тела в водной среде (нижняя

критическая температура раствора около 32°C) [35]. Температуру перехода можно изменить путем сополимеризации с гидрофильными мономерами, такими как акриловая кислота и акриламид. Несмотря на потенциальную важность термочувствительных гидрогелей в биомедицинских приложениях, пока что было описано несколько систем с использованием альгината, поскольку альгинат по своей природе не является термочувствительным. Однако структуры полувзаимопроникающей полимерной сети (semi-IPN) были получены посредством *in situ* сополимеризации N-изопропилакриламида (NIPAAm) с макромером поли(этиленгликоль)-*co*-поли(ε-капролактон) (PEG-*co*-PCL) в присутствии альгината натрия под воздействием УФ-излучения [36].

Коэффициент набухания гелей увеличивался с концентрацией альгината натрия при постоянной температуре и уменьшался с повышением температуры. Использование альгината натрия в структурах semi-IPN также улучшало механическую прочность и кумулятивное высвобождение BSA из гелей, что указывает на потенциал в приложениях для доставки лекарств [37].

Взаимодействие альгината с металлами:

Альгинат взаимодействует с солями металлов через карбоксилатные группы, формируя либо электростатические комплексы (щелочноземельные металлы), либо более прочные координационные связи (некоторые переходные металлы). Строение полимера (соотношение Г- и М-блоков) и природа металла определяют структуру и прочность образующихся гелей [38].

Двухвалентные ионы щелочноземельных металлов (Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+}) преимущественно формируют электростатические связи с карбоксилатными и гидроксильными группами четырех мономеров Г из двух соседних цепей полимеров альгината, реализуя так называемую модель "яйцо-коробка" [39,40] представленная на рисунке 2.

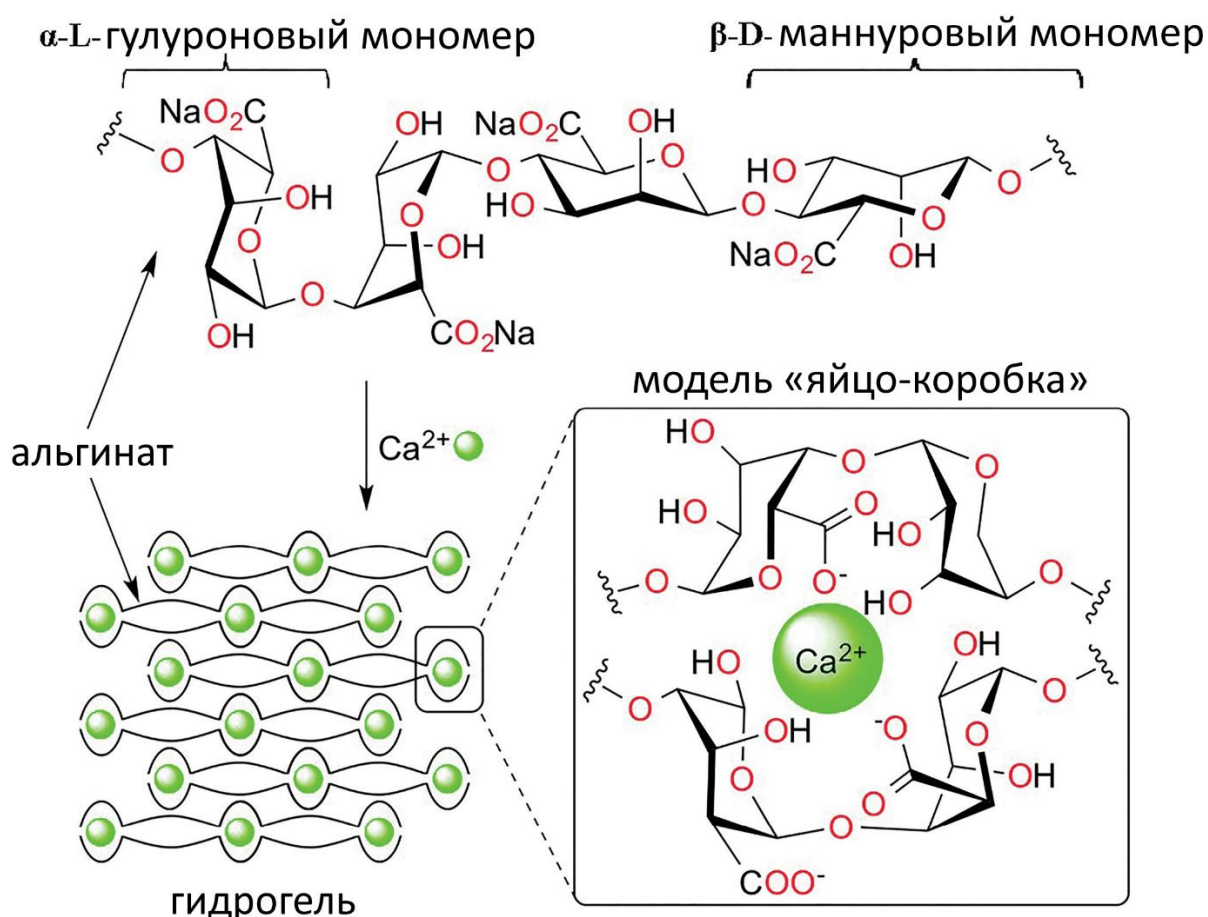


Рисунок 2 – Структура повторяющихся звеньев альгината натрия и образование гидрогеля путем координации катионов Ca²⁺ между соседними альгинатными цепями по модели «яйцевидной коробки» [41].

Свойства альгинатных гелей сильно зависят от соотношения и последовательности уроновых мономеров [42], концентрации ионов металлов и времени созревания [43]. Важно, что механическую прочность гидрогелей можно регулировать с помощью соотношений мономеров, что позволяет легко обрабатывать их в различных формах (например, шарики, трубки, мембраны).

В то же время переходные металлы (например, Cu²⁺) способны образовывать более прочные координационные (ковалентные) связи за счёт перекрытия d-орбиталей с карбоксилатами [44]. Однако кальциевые гели могут иметь ограниченную стабильность при физиологических условиях. В последние годы особое внимание уделяется трёхвалентным ионам, таким как Fe³⁺, которые образуют более плотные и стабильные сети с альгинатом благодаря более высокой

плотности зарядов и способности к координационному связыванию с несколькими карбоксильными группами [45]. Гели на основе Fe^{3+} проявляют повышенную механическую прочность (до 30–100% выше, чем у Ca^{2+} -гелей) и устойчивость к вымыванию ионами при физиологических условиях [46].

Альгинат образует гели при взаимодействии с солями Ba^{2+} , Sr^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} и др. Показано, что при гелеобразовании происходит почти полный обмен натрия на поливалентные ионы, а степень и характер связывания зависит от природы металла. Например, Pb^{2+} и Cd^{2+} имеют высокую аффинность к альгинату, что подтверждается измерением стабильности комплексов [44,47]. Аффинность альгината к разным ионам металлов уменьшается в ряду: $\text{Pb} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Ba} > \text{Sr} > \text{Ca} > \text{Co}=\text{Ni}=\text{Zn} > \text{Mn}$. Это объясняется особенностями строения и заряда катионов, а также их способностью к координации с Г- и М-блоками альгината [47].

Альгинат, как полимерная кислота, способен образовывать соли с ионами серебра. При контакте раствора альгината натрия с раствором нитрата серебра происходит ионный обмен: серебро замещает натрий или кальций в структуре альгината, формируя серебряный альгинат. Однако из-за того, что серебро - одновалентный ион, образование прочных волокон затруднено по сравнению с кальциевым альгинатом. Тем не менее, этот процесс используется для создания антимикробных материалов, где серебро высвобождается из волокна за счёт ионного обмена с компонентами окружающей среды [48].

Альгинат может выступать как стабилизатор и восстановитель при синтезе наночастиц серебра. В присутствии восстановителя (например, лактозы или под действием микроволнового излучения) ионы Ag^+ из нитрата серебра восстанавливаются до металлического серебра (Ag^0), а альгинат стабилизирует образующиеся наночастицы, предотвращая их агрегацию. В этом процессе карбоксильные группы альгината координируются с поверхностью наночастиц серебра, формируя устойчивые нанокомпозиты [49–51]. При синтезе серебряно-альгинатных композитов альгинат не только стабилизирует наночастицы, но и может влиять на их размер, форму и распределение. Например, увеличение концентрации нитрата серебра приводит к увеличению количества и размера

наночастиц, а также влияет на механические свойства полученных пленок [51]. В некоторых работах используется *in situ* восстановление: альгинат смешивают с раствором нитрата серебра и нагревают, при этом альгинат выполняет роль как восстановителя (превращая Ag^+ в Ag^0), так и стабилизатора [50]. Поскольку альгинат натрия полисахарид с большим количеством карбоксильных групп ($-\text{COO}-\text{COO}-$), способных связывать катионы металлов, то при добавлении нитрата серебра к раствору альгината натрия происходит ионный обмен: ионы серебра (Ag^+) замещают ионы натрия (Na^+) и координируются с карбоксильными группами альгината, образуя связи типа $\text{O}-\text{Ag}-\text{O}$. Это приводит к формированию серебросодержащих альгинатных комплексов или даже нерастворимого серебряного альгината, если концентрация серебра достаточна [52].

Восстановитель (или редуктор) - вещество, которое отдаёт электроны другому веществу, тем самым восстанавливая (то есть переводя в более низкую степень окисления) это вещество.

Для серебра восстановители - соединения или материалы, способные переводить ионы серебра (Ag^+) в металлическое серебро (Ag^0). Этот процесс важен для различных применений: реакция серебряного зеркала, синтез наночастиц, серебрение и реставрация изделий из серебра.

Основные восстановители серебра:

1. Альдегиды: В классической реакции Толленса (реакция серебряного зеркала) альдегиды (например, формальдегид или глюкоза) восстанавливают диаминсеребряный комплекс $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ до металлического серебра, которое осаждается в виде зеркального слоя на стекле.

Так было показано исследование синтеза серебряных наночастиц с помощью классической реакции Толленса, где альдегиды выступают восстановителями. Авторы используют формальдегид в качестве "часового механизма" для контроля времени реакции и изучают влияние pH и концентраций реагентов на кинетику и морфологию получаемых наночастиц серебра [53].

2. Формальдегид: используется в промышленности и лабораториях для восстановления ионов серебра до металлического состояния, особенно при химическом серебрении.

Исследование было посвящено кинетике и механизму восстановления ионов серебра формальдегидом в водной среде. Подробно анализируются параметры, влияющие на скорость образования наночастиц, их размер и морфологию, а также обсуждается промышленная применимость метода [54].

3. Глюкоза и другие сахара: являются мягкими и нетоксичными восстановителями, применяются как в аналитической химии (например, при реакции серебряного зеркала), так и при синтезе серебряных наночастиц.

Было описано использование глюкозы как восстановителя для синтеза серебряных наночастиц на основе наноцеллюлозы. Полученные наночастицы применяли для высокочувствительного определения концентрации глюкозы и как антибактериальный материал. Описаны условия синтеза и влияние концентраций реагентов на свойства наночастиц [55], также исследовали серебряные наночастицы, синтезированные с использованием глюкозы. Оценивали их размер, форму, стабильность и спектральные свойства [56].

4. Гидразин: Мощный восстановитель, иногда используется для получения высокочистого серебра в порошке.

Исследование посвящено кинетике образования серебряных наночастиц при восстановлении AgNO_3 гидразином в обратных мицеллах. Подробно описан механизм, влияние концентраций реагентов и условий среды на скорость нуклеации и роста наночастиц, а также их морфология и состав [57]. Гидразин сравнивался с другими восстановителями; показано, что он способствует получению наночастиц с наименьшим разбросом по размерам (узкое распределение) [58].

5. Аскорбиновая кислота (витамин С): применяется в "зелёной" химии для синтеза серебряных наночастиц как мягкий и экологически чистый восстановитель.

Например, в работе [56] сравнивали влияние различных восстановителей (аскорбиновая кислота, натрий боргидрид, гидразин, натрий цитрат, глюкоза) на свойства серебряных наночастиц. Установлено, что при использовании аскорбиновой кислоты получают равномерные сферические наночастицы диаметром около 20 нм с хорошей стабильностью и высокой однородностью. Такие частицы перспективны для сенсоров и антибактериальных материалов. В исследовании [58] сравнивали аскорбиновую кислоту, гидразин и натрий боргидрид для получения серебряных наночастиц в полимерных матрицах. При использовании аскорбиновой кислоты формировались частицы наибольшего размера (15,8 нм), а также отмечено влияние восстановителя на распределение по размерам и антимикробную активность.

6. Полиолы (например, этиленгликоль): используются в так называемом полиольном процессе для получения наночастиц серебра, особенно в материаловедении.

Разработан водный бинарный полиольный процесс с использованием полиэтиленгликоля (ПЭГ) и этиленгликоля (ЭГ) для синтеза серебряных наночастиц. Метод позволяет получать частицы с размером $15,8 \pm 2,2$ нм без дополнительных стабилизаторов при температуре 80 °С. Описаны стадии роста частиц, влияние концентрации ЭГ и подтверждена высокая антибактериальная активность полученных наночастиц против ряда патогенов [59]. Так же показан автоматизированный подход к синтезу серебряных наночастиц с помощью полиольного метода, позволяющий получать частицы с радиусом 3 и 5 нм по требованию. Работа акцентирует внимание на точном контроле размера и воспроизводимости процесса, что важно для применения в фотохимии, медицине и сенсорах [60]. Показан синтез и характеристика нанофлюидов на основе серебра, полученных полиольным методом с использованием этиленгликоля. Изучено влияние параметров синтеза на размер и стабильность наночастиц [61].

7. Олигохитозан: согласно современным исследованиям, олигохитозан может служить и восстановителем, и стабилизатором при синтезе серебряных

наночастиц, что делает его экологически безопасной альтернативой традиционным реагентам.

Описан синтез нанодисперсий серебра, стабилизированных олигохитозаном. Синтез контролировали с помощью электронных спектров. Полученные материалы показали перспективность для заживления ран благодаря высокой биосовместимости и стабильности [62]. Проведено сравнительное исследование двух методов получения нанокомпозитов серебра с хитозаном, где хитозан выступает в роли матрицы и стабилизатора. Описана химическая связь между аминогруппами хитозана и поверхностью серебра, что обеспечивает стабильность и равномерное распределение наночастиц [63]. В этой работе представлен "зелёный" одностадийный синтез серебряных наночастиц, где хитозан (в том числе олигохитозан) играет роль восстановителя и стабилизатора. Изучено влияние температуры и давления на формирование частиц, подтверждена высокая антибактериальная активность и сниженная цитотоксичность по сравнению с цитратными наночастицами [64].

8. Альгинат натрия может выступать не только как лиганд, но и как мягкий восстановитель. При определённых условиях (нагрев, воздействие света, плазмы или добавление сильного восстановителя, например, NaBH_4) ионы Ag^+ восстанавливаются до металлического серебра (Ag^0), что сопровождается появлением характерной окраски (от жёлтого до коричневого), связанной с плазмонным резонансом наночастиц серебра [50,51,65].

Физикохимические основы разработки и функционализации альгинатных микрокапсул

Альгинатные микрокапсулы привлекают внимание исследователей благодаря своей биосовместимости и широкому спектру применения в биомедицине. Современные методы модификации и армирования таких капсул позволяют значительно улучшить их физико-химические свойства и функциональность. В частности, использование нанопфибрилл хитина и ионного сшивания способствует

повышению механической прочности и стабильности капсул. Кроме того, интеграция металлических наночастиц открывает новые возможности для создания multifunctional систем с уникальными оптическими и биологическими характеристиками.

Недавние исследования демонстрируют создание микрокапсул на основе альгината, дополнительно армированных наноприфибрами хитина и сшитых как двухвалентными (Ca^{2+}), так и трёхвалентными (Fe^{3+}) ионами [46] такие капсулы обладают улучшенной механической стабильностью и пористостью, что способствует лучшему обмену веществ и росту клеток. Fe^{3+} -сшитые капсулы показывают более высокую упругость и устойчивость к дегелированию при многократных промываниях, а также стимулируют клеточную пролиферацию и миграцию [46].

Стабилизация металлических наночастиц, например золота (Au NPs), в матрице альгината позволяет создавать функциональные капсулы с уникальными оптическими и биологическими свойствами. Метод микроволновой плазмы в жидкости (MWPLP) позволяет синтезировать Au NPs в присутствии альгината, который ускоряет реакцию, предотвращает агрегацию частиц и обеспечивает долгосрочную стабильность коллоидов. Размер наночастиц можно контролировать концентрацией альгината, что важно для биомедицинских применений, так как размер влияет на распределение в организме, метаболизм и цитотоксичность [66]. Разработан способ инкапсуляции металлических наночастиц (Au, Ag, CdSe, EuSe) в альгинатном геле для *in vivo* визуализации и доставки лекарств. Синтез наночастиц происходит непосредственно внутри геля при помощи УФ-облучения и клеточного лизата рекомбинантных бактерий. Система обеспечивает pH-зависимый выпуск лекарств и не требует токсичных восстановителей или сурфактантов [67]. Предложен способ мечения альгинатных микрокапсул золотыми наночастицами, что позволяет отслеживать их положение с помощью микро-КТ. Капсулы стабильны, малотоксичны и хорошо видны на рентгене, что важно для отслеживания доставки лекарств и клеток *in vivo* [68]. Был разработан одностадийный метод синтеза золотых наночастиц, стабилизированных

альгинатом, с использованием микроволновой плазмы в жидкости. Размер и стабильность AuNPs зависят от концентрации альгината, а сами наночастицы пригодны для биомедицинских применений благодаря отсутствию токсичных реагентов [66]. Было показано, что комбинация альгината и хитозана улучшает прикрепление и пролиферацию клеток в 3D-культурах, а также обеспечивает механическую стабильность гидрогелей. Такие композиты используются для создания структур, имитирующих микросреду хряща [69]. Также показана технология получения микрокапсул с ядром из альгината и оболочкой из хитозана, которые защищают инкапсулированные вещества от кислой среды желудка и обеспечивают их высвобождение в кишечнике. Концентрация хитозана влияет на морфологию и скорость высвобождения содержимого [70].

Кроме того, в области биомедицинских и аналитических приложений особое значение приобретает использование наночастиц в качестве чувствительных субстратов для обнаружения различных аналитов. В настоящее время универсальным и мощным методом быстрой идентификации и обнаружения различных аналитов, таких как лекарства, загрязняющие вещества, биомолекулы, микроорганизмы и раковые клетки, является гигантское комбинационное рассеяние (ГКР). Поскольку эффективность метода сильно зависит от материала, морфологии и условий возбуждения поверхностных плазмонов, крайне важно создавать надежные, чувствительные и воспроизводимые субстраты ГКР. Обычно наночастицы серебра и золота являются наиболее часто используемыми материалами для таких субстратов благодаря своим уникальным оптическим свойствам, в частности локализованному плазмонному резонансу и способности концентрировать электромагнитное поле в межчастичных соединениях. По сравнению с серебром, золото обладает большей стабильностью и биосовместимостью, однако серебро зачастую обеспечивает более сильный эффект ГКР из-за более резкого резонанса и меньшей мнимой части показателя преломления на резонансной частоте [71]. Было предложено множество методов изготовления высокоэффективных структур ГКР, начиная от самосборки на поверхностях, литья капель, центрифугирования, осаждения на подложках до

лазерного осаждения и литографических подходов. Среди них особое внимание уделялось выращиванию плазмонных наночастиц непосредственно на различных подложках, таких как стекло [72], кремний [73], наносферы кремния [74] или полимерные пленки [75]. Такой подход позволяет получать хорошо упорядоченные и равномерно расположенные металлические наночастицы даже в матрицах гидрогелей [76] и альгинатных шариках [8], что значительно расширяет возможности их применения в биомедицине и аналитике. Однако большой размер альгинатных шариков/капсул ограничивает их применение в качестве системы доставки лекарств, особенно для внутривенного введения. Таким образом, был разработан подход с использованием шаблона с использованием искусственных коллоидных микрочастиц как простой и универсальный метод для создания функциональных микросфер, начиная от полых полиэлектролитных микрокапсул [77–79] и заканчивая плазмонными микросферами [6,80,81]. Среди многочисленных твердых шаблонов микрочастицы карбоната кальция (CaCO_3) в модификации ватерит [82–84] заслуживают особого внимания из-за их особых особенностей, таких как недорогой материал, биосовместимый [85], мягкие условия разложения [86] и пористая структура [87].

Пористость является ценной характеристикой микрочастиц CaCO_3 , которая позволяет включать в себя различные молекулы, такие как инсулин [88–90], окисленную глюкозу [91], терапевтический фермент [92], фотодинамический краситель [86,93,94], а также металлические наночастицы без помощи дополнительной функционализации [95,96]. Удельная поверхность микрочастиц CaCO_3 может варьироваться от 1,5 до 16,14 $\text{м}^2/\text{г}$, радиус пор составляет 2,62–6,68 нм, объем пор - от 2,43 до 37,97 $\text{см}^3/\text{г}$ [97]. Эти параметры зависят от условий синтеза: pH, температурного режима, концентраций исходных реагентов, наличия и типа поверхностно-активных веществ, скорости перемешивания и времени реакции. Например, максимальная поверхность достигается при минимальном времени реакции и низкой концентрации Na_2CO_3 , а радиус пор уменьшается при увеличении концентрации реагентов и pH [97].

Однако частицы CaCO_3 невыгодны для использования в качестве носителя из-за их нестабильности в водных растворах и слабой защиты инкапсулированных материалов. Карбонат кальция растворим в кислых и частично в нейтральных водных средах (особенно при высоком CO_2 или пониженном pH), что ведёт к разрушению частиц и высвобождению содержимого. [86]. Для защиты такого носителя покрытие ядра CaCO_3 в настоящее время достигается в основном электростатическим осаждением ряда полиэлектролитов [98], что является довольно дорогой и трудоемкой технологией.

Высвобождение инкапсулированных агентов: механизмы и ключевые параметры

В последние годы методы контролируемого высвобождения инкапсулированных агентов привлекают значительное внимание в области физикохимии и биомедицинских приложений. Разработка эффективных стратегий десорбции позволяет повысить точность доставки и эффективность терапевтических средств. Среди различных подходов особое место занимают методы, основанные на внешних стимулах, таких как изменение pH, манипулирование зарядом поверхности и ферментативное расщепление. Ультразвуковое воздействие выделяется как перспективный способ активации высвобождения, благодаря возможности точного контроля параметров и наличию клинически одобренного оборудования.

Десорбция инкапсулированных агентов возможно с помощью ферментативного расщепления полых капсул [92,99], манипулирования зарядом поверхности капсулы [100], pH [101–104] и механизмов высвобождения, основанных на перекристаллизации [105]. Ультразвук использовался для запуска высвобождения инкапсулированного материала из полиэлектролитных многослойных капсул [106–109]. Было обнаружено, что проницаемость и целостность оболочки капсулы зависят от плотности носителя, а также от плотности мощности, частоты и продолжительности ультразвукового воздействия

[110]. Доступно клинически одобренное оборудование, и был исследован широкий спектр параметров (частоты в диапазоне от 20 кГц до 3 МГц и интенсивности от 0,1 до 100 Вт/см²) для высвобождения лекарств, стимулируемого ультразвуком [111]. Недавно были достигнуты интенсивности ультразвука, необходимые для высвобождения в диапазоне тех разрешено использовать в медицинских целях [112]. Размер частиц имеет важное значение для применения *in vivo* [113,114] и, в частности, для тераностических применений [115]. В последнем случае были продемонстрированы частицы разных размеров, собранные в многокомпонентный носитель [116].

Физические поля хорошо подходят для стимуляции контролируемого внутриклеточного высвобождения, и они могут быть реализованы различными способами: взаимодействие лазера и наночастиц (локализованное тепло) [117], взаимодействие магнита и магнитной наночастицы (тепло [118] и/или деформация [119]), ультразвук [106] (кавитация) и механическое воздействие [120]. Существуют различные механизмы фотоинициации, включая конъюгаты полимер-фоточувствительный линкер-лекарство [121], светочувствительные полимеры со структурными изменениями [122], локализованный нагрев на основе лазера и наночастиц. В случае взаимодействия лазера и наночастиц на полимерных капсулах [123] высвобождение может осуществляться двумя различными способами. Было показано, что в зависимости от плотности наночастиц в стенке микрокапсулы высвобождение может быть неразрушающим [117] или взрывным [124]. Последнее может быть использовано в фототермической терапии раковых клеток, при которой клетки разрушаются за счет чрезмерного накопления тепла вокруг наночастиц. Поскольку клетки и биологические объекты в значительной степени состоят из воды и поскольку вода прозрачна для света, особенно в ближней инфракрасной части спектра (~ 700–900 нм) [125], лазерно-индуцированное высвобождение может быть реализовано внутри живых клеток [126]. В одном конкретном примере оно использовалось для управления поверхностным представлением небольших пептидов [105], имеющих значение для защиты иммунной системы. В клетках, обработанных наночастицами, все

биологические вещества прозрачны для света, за исключением металлических наночастиц или светочувствительных органических молекул, специально введенных в оболочку для поглощения света и запуска высвобождения содержимого наночастицы.

Современные достижения в области нанотехнологий позволяют не только управлять биологическими процессами внутри отдельных клеток с помощью фототермического эффекта, но и расширяют возможности исследований на уровне целых организмов, включая модельные системы, такие как нематоды *C. elegans*, функционализированные различными типами наночастиц. Так *C. elegans* были функционализированы с помощью клеток, легированных золотыми или магнитными наночастицами. Такие поверхностно-функционализированные нематоды остаются жизнеспособными и нормально размножаются, демонстрируя дополнительную функциональность при выбранной электромагнитной обработке [127]. Поглощение небольших плазмонных наночастиц (<100 нм) [128] у *C. elegans* было продемонстрировано для золотых [129], магнитных [130,131], и серебряных наночастиц [132,133] в качестве контрастного агента для интерференционной контрастной микроскопии, рамановских зондов, нацеленных на липиды в кишечнике [134], и триггера поведенческих реакций [131]. Эксперименты с микросферами показывают, что глотка *C. elegans* в сочетании с ротовой полостью настроена на специфический захват и транспортировку частиц в диапазоне размеров, соответствующем большинству почвенных бактерий (0,5–3 мкм) [135].

Двойниковые дефекты в наночастицах серебра

Двойниковые дефекты в серебре — это ключевой фактор, определяющий морфологию, механические и электрические свойства материала на микро- и наноуровне. Их формирование зависит от условий роста, состава среды и может быть целенаправленно использовано для создания материалов с заданными свойствами.

1. Механизмы формирования

Двойниковые дефекты (двойники) — это особые границы в кристалле, где части кристаллической решётки ориентированы зеркально относительно друг друга. Такие дефекты часто встречаются в металлах с кубической гранецентрированной решёткой, к которым относится серебро. Формирование двойниковых плоскостей существенно влияет на морфологию и свойства наночастиц серебра, а также на их механические и электрические характеристики [136].

2. Влияние двойников на свойства и морфологию наночастиц серебра

Двойниковые дефекты могут возникать при росте наночастиц серебра, особенно при определённых условиях синтеза, например, при наличии ионов серебра и специфических добавок, влияющих на скорость осаждения и пассивацию поверхности. При высоких концентрациях ионов Ag^+ формируются двойниковые частицы, что связано с низким энергетическим барьером для образования двойниковых дефектов [136].

Двойники в наночастицах серебра способствуют формированию определённых форм, таких как декаэдры и треугольные пластины, которые имеют низкоэнергетические $\{111\}$ поверхности. Эти поверхности способны аккумулировать большее количество серебра по сравнению с однокристаллическими наночастицами [137].

Изменение состава анионов (например, увеличение содержания иода в AgBr-I) также способствует появлению двойниковых дефектов, что приводит к изменению формы нанокристаллов с кубической на гексагональную [137].

3. Двойниковые границы и их роль в механических и электрических свойствах

Двойниковые границы в серебре могут служить источниками для образования иерархических двойников — многоуровневых структур, которые

повышают способность материала к упрочнению за счёт блокировки движения дислокаций [136].

Дефектные двойниковые границы могут инициировать образование вторичных и более сложных двойников, включая пятислойные структуры, что подтверждено как экспериментально (*in situ* ПЭМ), так и с помощью молекулярной динамики [136].

Двойниковые границы влияют на электрическое сопротивление серебра: расчёты показывают, что вклад двойниковых границ в удельное сопротивление серебра составляет порядка 8×10^{-8} мкОм·см² на единицу плотности двойников.

4. Классификация двойниковых дефектов

Существует несколько типов двойников [138]:

- Контактные двойники — две части кристалла соприкасаются по одной плоскости и выглядят как зеркальные отражения друг друга.
- Проникающие двойники — кристаллы как бы "проникают" друг в друга.
- Множественные и циклические двойники — формируются при повторяющемся двойниковании по одной или нескольким осям, например, пятислойные или шестиугольные структуры.

Понимание механизмов образования двойниковых дефектов в серебре важно для управления морфологией и свойствами наночастиц, что находит применение в катализе, электронике и создании новых функциональных материалов. Двойниковые дефекты позволяют улучшать механические свойства (прочность, пластичность) и контролировать электрические характеристики серебра за счёт инженерии дефектов [136,139].

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Вторая глава посвящена получению и исследованию физико-химических свойств полых микроконтейнеров на основе шаблонного изготовления гибрида, состоящего из органической биосовместимой альгинатной матрицы и неорганических наночастиц серебра. Подходы к иммобилизации биологически активных веществ и магнитных наночастиц в микроконтейнеры, зависимости физико-химических свойств гибридных контейнеров от условий их получения, состава и структуры оболочки, оценка коэффициента усиления сигнала гигантского комбинационного рассеяния на поверхности гибридных микроконтейнеров.

2.1 Материалы

Дигидрат хлорида кальция $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich (Германия)

Карбонат натрия Na_2CO_3 , Sigma-Aldrich (Германия)

Этиленгликоль $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$, Sigma-Aldrich (Германия)

Альгинат Натрия $(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6)_n$, Sigma-Aldrich (Германия)

Нитрат серебра AgNO_3 , Sigma-Aldrich (Германия)

Аскорбиновая кислота $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, Sigma-Aldrich (Германия)

Тетраметилродамин бычий сывороточный альбумин (ТРИЦ - БСА) 70 кДа, Sigma-Aldrich (Германия)

Натрий-фосфатный буфер (PBS) Sigma-Aldrich (Германия)

Во всех экспериментах была использована сверхчистая деионизованная вода с удельным сопротивлением выше 18,2 МОм см.

2.2 Методики формирования микроразмерных частиц карбоната кальция

Сферические микрочастицы карбоната кальция (средний диаметр $3,0 \pm 0,3$ мкм) были синтезированы согласно протоколу, разработанному Володькиным и др. [87]. Процесс синтеза включал одновременное добавление 1 мл 0,33 М водного раствора солей дигидрата хлорида кальция и карбоната натрия в стеклянный стаканчик. Смесь подвергалась интенсивному перемешиванию на магнитной мешалке с использованием магнитного ротора при скорости 500 об/мин в течение 1 минуты, что способствовало полной кристаллизации карбоната кальция в полиморфной фазе ватерита. Осажденные микрочастицы CaCO_3 собирались с помощью центрифугирования при 2000 об/мин в течение 2 минут и далее промывались чистым этанолом. Данная процедура промывания повторялась три раза, после чего полученные микрочастицы сушились в сушильной печи при температуре 60 °C в течение 30 минут.

Для синтеза микрочастиц карбоната кальция со средним диаметром $1,0 \pm 0,1$ мкм применялся аналогичный метод, описанный Свенской и др. [140], за исключением того, что перемешивание реакционной смеси осуществлялось с использованием ультразвукового гомогенизатора («Sonopuls», Bandelin, Германия) с частотой 20 кГц и плотностью мощности 1 Вт/см² в течение 1 минуты.

2.3 Методика формирования субмикронных частиц карбоната кальция

Для получения микрочастиц карбоната кальция со средним диаметром $0,8 \pm 0,2$ мкм был использован протокол, разработанный Парахонским и др. [105]. В рамках данного эксперимента синтез осуществлялся путем осаждения солей дигидрата хлорида кальция и карбоната натрия в равных объемах в среде этиленгликоля. Для этого в системе использовались водные растворы солей в объеме 12 мл, смешанные

с этиленгликолем в концентрациях 0,33 М (для солей) и 83% (для этиленгликоля) соответственно, в соотношении 1:5.

Процесс смешивания двух солевых растворов осуществлялся с помощью магнитной мешалки при скорости движения 700 об/мин в течение 3 часов. Осажденные микрочастицы карбоната кальция были собраны центрифугированием (3200 об/мин в течение 5 минут), после чего трижды были промыты этиловым спиртом и поддавались сушке при температуре 60 °С в течение 30 минут.

2.4 Методики иммобилизации модельных соединений в мезопористые частицы карбоната кальция.

Сорбция макромолекул модельного конъюгата ТРИЦ-БСА в микрочастицы CaCO_3 проводилась методом адсорбции. В данном эксперименте 20 мг сухих частиц CaCO_3 были диспергированы в 0,5 мл водного раствора ТРИЦ - БСА с концентрацией 1 мг/мл и выдерживались в этом растворе в течение 30 минут при условиях непрерывного встряхивания с использованием шейкера. После завершения адсорбционного процесса суспензия микрочастиц подвергалась центрифугированию (2500 об/мин, 2 мин), после чего микрочастицы были промыты однократно деионизованной водой.

Аналогичным образом осуществлялась загрузка молекул конъюгата ТРИЦ - декстрана в микрочастицы CaCO_3 . Сначала 25 мг микрочастиц CaCO_3 загружались конъюгатом ТРИЦ - декстрана, для чего использовался 1 мл раствора с концентрацией 1 мг/мл. Процесс адсорбции также проходил в течение 30 минут. Полученная суспензия с микрочастицами подвергалась центрифугированию (3000 об/мин, 3 мин) и, как и в предыдущем случае, была промыта однократно деионизованной водой.

2.5 Синтез наночастиц магнетита

Наночастицы магнетита были получены методом химического осаждения [141]. В частности, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1,3 г) и $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,48 г) были растворены в 25 мл воды при комнатной температуре. Газообразный азот барботировался через все растворы в закрытых ячейках в течение 5 минут перед синтезом. Сначала в реакционную ячейку было введено 150 мл 0,1 М NaOH, который затем был нагрет до 40 °С в атмосфере азота при слегка повышенном давлении для обеспечения вытеснения кислорода. Затем в реакционную ячейку в течение нескольких секунд был введен раствор солей железа и оставлен на 30 секунд для смешивания. При контакте растворов гидроксида натрия и солей железа началось зародышеобразование магнетита, что выразилось в образовании темно-коричневого осадка наночастиц оксида железа (III). Для стабилизации было введено 25 мл лимонной кислоты (32 мг/мл) при постоянном перемешивании. Чтобы удалить избыток лимонной кислоты и предотвратить дальнейшее растворение наночастиц магнетита, гидрозоль магнетита диализовали в воде в течение 3 дней при медленном постоянном перемешивании. Средний размер наночастиц магнетита, измеренный по изображениям просвечивающей электронной микроскопии с помощью программного обеспечения ImageJ, составил 5 нм.

2.6 Методика создания полых гидрогелевых микроконтейнеров формируемые на ядрах ватерита

Микроконтейнеры были получены путем адсорбции альгината натрия на мезопористые микрочастицы ватерита. Процесс адсорбции осуществлялся добавлением 1 мл раствора натриевой соли альгиновой кислоты (концентрация 5 мг/мл) к 20 мг предварительно синтезированных частиц CaCO_3 . Данная

реакционная смесь подвергалась перемешиванию в течение 10 минут. После завершения адсорбции суспензию микрочастиц ватерита центрифугировали при скорости 2500 об/мин в течение 2 минут, после чего частицы промывались трижды деионизированной водой.

Для инициирования процесса гелеобразования альгината натрия на поверхности частиц CaCO_3 в суспензию добавлялась соль нитрата серебра. Для восстановления серебряных зародышей до наночастиц серебра в матрице альгината и одновременного удаления ядра карбоната кальция в реакционную смесь дополнительно вводили 500 мкл раствора аскорбиновой кислоты концентрацией 0,1 М. Инкубация проводилась в шейкере в течение 10 минут. После инкубации суспензия подвергалась центрифугированию при скорости 2000 об/мин в течение 3 минут и промывалась трижды деионизированной водой. Полученные микроконтейнеры хранились в деионизированной воде.

2.7 Методика создания полых гидрогелевых микроконтейнеров с наночастицами магнетита

2.7.1 Адсорбция магнетита

Для проведения адсорбции 40 мг порошка микрочастиц CaCO_3 ресуспендировали в 2,5 мл раствора магнитных наночастиц (МНЧ) путем встряхивания в течение 30 мин. Затем микрочастицы дважды осаждали центрифугированием (по 3 мин при 1000 gcf) и ресуспендировали в воде.

2.7.2 Соосаждение магнитных наночастиц в ядра CaCO_3

В стакан с наночастицами магнетита (2,5 мл) одновременно добавляли по 615 мкл 1 М растворов Na_2CO_3 и CaCl_2 . Полученную суспензию перемешивали в течение 2 мин при 600 об/мин с помощью магнитной мешалки, после чего промывали водой посредством трех циклов центрифугирования и ресуспендирования.

2.7.3 Получение полых гибридных микроконтейнеров

Получение микроконтейнеров осуществляли согласно ранее опубликованному протоколу (раздел 2.6). К 40 мг свежеприготовленных микрочастиц CaCO_3 (с магнитными наночастицами или без них) добавляли 1 мл раствора альгината натрия (5 мг/мл), перемешивая на шейкере 10 мин. Микрочастицы CaCO_3 , покрытые альгинатом натрия, трижды промывали деионизированной водой. Затем добавляли 0,5 мл 0,75 М раствора нитрата серебра для сшивания альгината.

Для получения полых микроконтейнеров с МНЧ в оболочке, МНЧ адсорбировали на альгинате натрия или нитрате серебра, перемешивали 10 мин и промывали деионизированной водой. Далее медленно добавляли 0,5 мл раствора аскорбиновой кислоты в концентрации 0,1 М для растворения CaCO_3 и синтеза наночастиц серебра. Полученные микроконтейнеры промывали и выдерживали в воде.

2.7.4 Количественное определение наночастиц магнетита в микроконтейнерах методом колориметрического титрования

Количество наночастиц магнетита, загруженных в микроконтейнеры, определяли методом колориметрического титрования. Для этого 0,5 мл суспензии микрооболочек растворяли добавлением 0,114 мл раствора серной кислоты в концентрации 1 М и разбавляли водой до 4 мл. Затем, при интенсивном перемешивании, добавляли 2 мл четырехмолярного раствора роданида аммония. В качестве стандарта использовали раствор железа (III) (0,1 мг/мл) в 1 М H_2SO_4 . Колориметрическое титрование проводили по изменению цвета в результате реакции стандартного раствора железа (III) с 4 М роданидом аммония.

2.7.5 Оценка стабильности микроконтейнеров

Для оценки стабильности 10 мкл микроконтейнеров ресуспендировали в DPBS (фосфатно-солевой буфер Дульбекко), DMEM (модифицированная по Дульбекко среда Игла) и 0,9% растворе NaCl, после чего инкубировали в течение 3 и 7 дней для последующего анализа с помощью сканирующей электронной микроскопии.

2.8 Методы исследования и характеристики образцов

2.8.1 Исследование воздействия ультразвуковой обработки

Ультразвуковая ванна (Sapfir, Россия) была использована для ультразвуковой обработки микроконтейнеров альгината серебра с частотой 35 кГц и плотностью мощности 0,64 Вт/см².

2.8.2 Исследования образцов методом сканирующей электронной микроскопией

Описание морфологии частиц проводилась на основе изображений, полученных с использованием сканирующей электронной микроскопии и трансмиссионной электронной просвечивающей микроскопии. Измерения, выполненные при помощи СЭМ, осуществлялись на приборе LMU MIRA II (Tescan) при рабочем напряжении 30 кВ в режимах вторичных электронов и обратного электронного рассеяния. Увеличение изображений варьировалось в диапазоне от 100 до 40 000. Подготовка образцов осуществлялась путем высушивания капли водного раствора объемом 10 мкл суспензии микроконтейнеров на кремниевой пластине.

2.8.3 Определение размера частиц по изображениям, полученным методом сканирующей электронной микроскопии

Для определения распределения частиц ватерита различного размера была проведена пост-обработка и анализ микрофотографий, полученных с помощью сканирующей электронной микроскопии, с использованием программного

обеспечения ImageJ (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Для каждого образца было выполнено не менее 100 измерений.

2.8.4 Исследование образцов методом просвечивающей электронной микроскопией

Исследование с использованием трансмиссионной электронной микроскопии и сканирующей трансмиссионной электронной микроскопии проводилось на приборе Titan 80-300 ПЭМ/СПЭМ (FEI, США), который был оснащен эмиссионной пушкой Шоттки и системой энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (EDXS; EDAX, США). Исследования проводились при напряжении 300 кВ в режиме светлопольной микроскопии СПЭМ (BF) и ТЕМ с высоким разрешением (HR). Образцы подготавливались путем высушивания капли водной суспензии микрочастиц на медной подложке.

2.8.5 Определение положения наночастиц серебра по микроизображениям, полученным методом просвечивающей электронной микроскопией

Для определения положения наночастиц серебра проводилась постобработка микрофотографий с использованием программного обеспечения Digital Micrograph (Gatan, США) и TIA (FEI, США).

2.8.6 Исследование образцов методом флуоресцентной микроскопии

Флюоресцентная визуализация полых гибридных микроконтейнеров, загруженных молекулами конъюгата ТРИЦ-БСА, осуществлялась с применением флуоресцентного конфокального лазерного сканирующего микроскопа TCS SP8 (Leica, Германия). Образцы готовили путем выкапывания 5 мкл каждого образца, окрашенного конъюгатом ТРИЦ-БСА, на поверхность покровного стекла для визуализации. Длина волны возбуждения составляла 552 нм, флуоресценция конъюгата ТРИЦ-БСА наблюдалась при длинах волн 565 и 620 нм.

2.8.7 Исследование образцов методом гигантского комбинационного рассеяния

Спектры комбинационного рассеяния были получены на конфокальном рамановском микроскопе WI Tec Alpha 300 R +, оснащенном CCD-камерой с охлаждением до -70°C (Andori Dus 401BR-DD) и 785 нм диодным лазером (Toptica, XTRAP). Монослой 4-нитротиофенольных (4-NTP, Sigma) молекул адсорбировался на поверхности серебра, что служило сигнальными молекулами для количественной оценки коэффициента усиления субстрата ГКР [2]. Для этого микроконтейнеры инкубировали в растворе 4-нитротиофенола в концентрации 1 мМ, растворенного в этаноле, в течение 12 ч. Затем микроконтейнеры промывали четыре раза этанолом (центрифугирование в течение 3 мин при 3000 об/мин) для удаления избыточных, несвязанных молекул. В завершение, этанол был заменен деионизованной водой. Спектры ГКР были получены с использованием объектива Nikon Plan Fluor 10x / 0,3, при мощности лазера 300 мкВт и времени интегрирования 0,13. Спонтанное комбинационное рассеяние 50 мМ 4-нитротиофенола, растворенного в этаноле, измеряли в идентичных условиях, но

при мощности лазера 100 мВт. Высота измеряемого объема составляла 160 мкм от осевого слоя сканирования TiO_2 толщиной 50 нм, нанесенного на подложку из CaF_2 .

2.8.8 Определение эффективности загрузки красителем образцов с помощью метода с помощью метода спектрофотометрии

Концентрация фотосенсибилизатора в растворе (n) определялась по формуле:

$$n = \frac{I-b}{m} \quad (1)$$

где I – измеренная интенсивность флуоресценции раствора,

b и m – коэффициенты в уравнении калибровочной зависимости

$$I = m \cdot n + b \quad (2)$$

Дисперсия величины n (σ_n^2), вытекающая из калибровочной зависимости, в соответствии с методикой [142], рассчитывалась по формуле:

$$\sigma_n^2 = \frac{\sigma_I^2}{m^2} \left(1 + \frac{1}{D} (Nn^2 - 2n\sum n_i + \sum n_i^2) \right), \quad (3)$$

$$\text{где } \sigma_I^2 = \frac{\sum (I_i - mn_i - b)^2}{N-2};$$

$$D = N \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2;$$

N – число измерений.

Расчеты производились при помощи программы «Microsoft Excel».

Концентрация и, как следствие, масса ($M_{\text{супернатанта}}$) свободного (некапсулированного) конъюгата ТРИЦ-БСА рассчитывалась на основе экспериментальной калибровочной кривой.

Загрузочную способность микроконтейнеров (W) определяли как отношение массы инкапсулированного вещества ($M_{\text{загрузки}}$) к соответствующей массе незагруженных микрочастиц ($M_{\text{частиц}}$):

$$W = \frac{M_{\text{начальная}} - M_{\text{супернатанта}}}{M_{\text{частиц}}} = \frac{M_{\text{загрузки}}}{M_{\text{частиц}}} \cdot 100\% \quad (4)$$

где M – начальная масса конъюгата ТРИЦ-БСА, которая была добавлена к суспензии для сорбции.

2.8.9 Высвобождение полезной нагрузки с помощью маломощной ультразвуковой (разрешенной для медицинского применения) стимуляции

Для изучения процесса десорбции соединений из микроконтейнеров в качестве модельного вещества был использован модельный конъюгат ТРИЦ-БСА. В рамках эксперимента было подготовлено пять идентичных образцов для каждого из трех классов микроконтейнеров. В 1 мкл суспензии микроконтейнеров (концентрация 8 мг/мл) помещали в ультразвуковую ванну, после чего образцы подвергались ультразвуковому воздействию с частотой 35 кГц и мощностью 0,64 Вт/см². В процессе обработки пробирки последовательно извлекались из ванны через установленные временные интервалы (1, 15, 35, 45, 60, 120 и 180 минут). Данная процедура проводилась для каждого независимого образца и класса микроконтейнеров. После завершения ультразвуковой обработки суспензии центрифугировались для получения осадков. Концентрация десорбируемых веществ определялась в надосадочном растворе с использованием спектрофотометрии, а количество разрушенных микроконтейнеров были исследованы с помощью сканирующей электронной микроскопии.

ГЛАВА 3. Создание, загрузка и характеристика микроразмерных и субмикронных гибридных контейнеров

Многофункциональные гибридные микроконтейнеры были получены путем адсорбции альгината натрия на пористые частицы ватерита с последующим гелеобразованием альгината натрия ионами серебра при добавлении нитрата серебра. Нитрат серебра был предварительно загружен в матрицы ядер карбоната кальция с использованием метода адсорбции из водного раствора, что обеспечило равномерное распределение нитрата серебра в реакционной системе. Процесс восстановления ионов серебра до наночастиц серебра в матрице альгината был осуществлён в условиях одновременного удаления ядра ватерита, что обеспечивалось добавлением раствора аскорбиновой кислоты. Данный подход позволяет не только добиться формирования альгинатных серебряных контейнеров с заданными свойствами, но и обеспечить стабильность полученных структур (рисунок 3) [143].

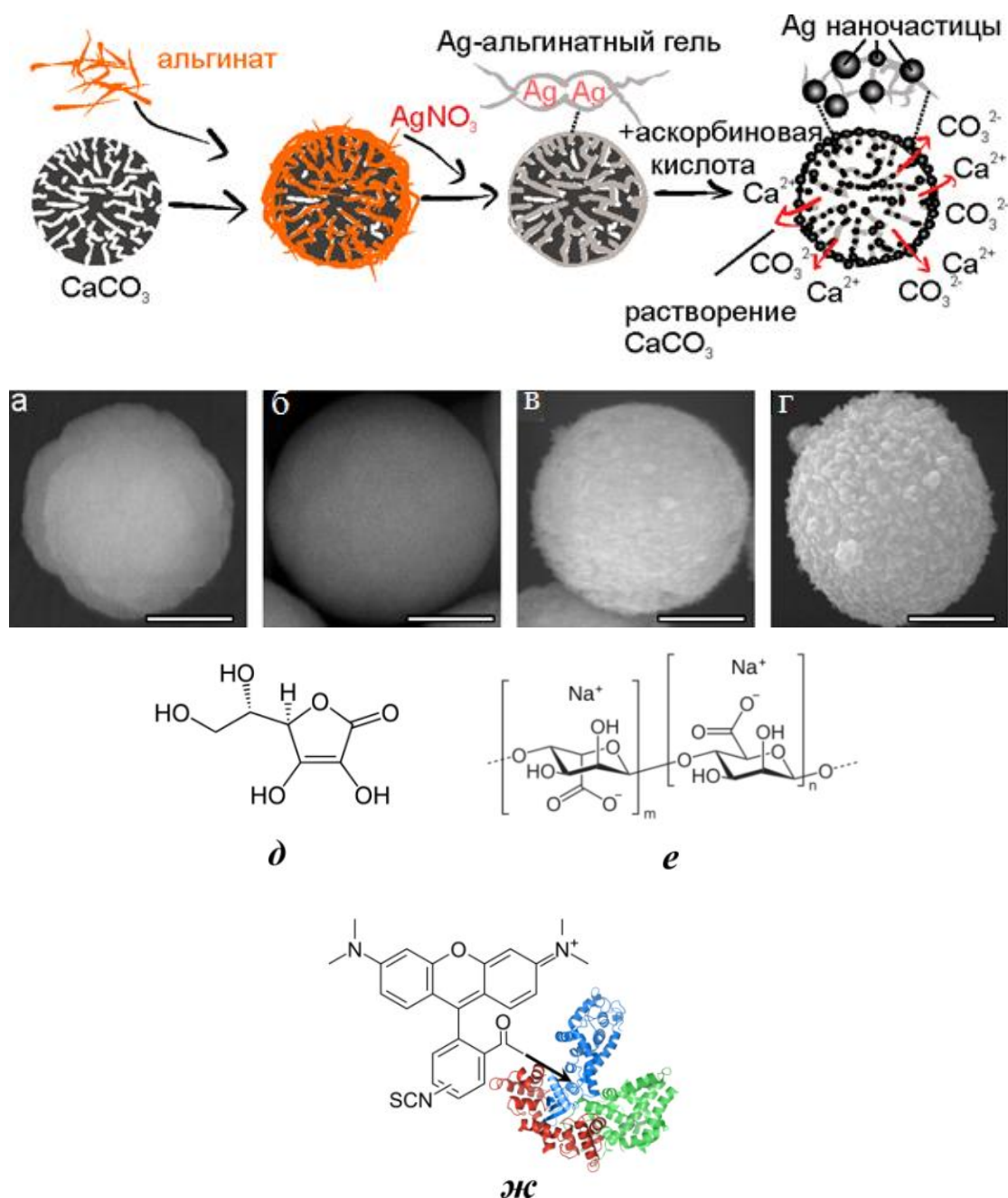


Рисунок 3 – Схема получения микроконтейнеров, состоящих из альгинатной матрицы и наночастиц серебра. СЭМ - изображения соответствуют: CaCO_3 (а); CaCO_3 после сорбции альгината натрия (б); CaCO_3 -ядра после адсорбции альгината натрия и нитрата серебра (в); полая модифицированная структура (г), состоящая из альгината натрия и наночастиц серебра. Масштабные линейки соответствуют 1 мкм. Структурные формулы: аскорбиновой кислоты (д); альгината натрия (е); бычьего сывороточного альбумина, конъюгированного с флуоресцентным красителем (ТРИЦ-БСА) (ж).

Для исследования влияния присутствия и локализации наночастиц магнетита на размер, форму и морфологию гидрогелевых микроконтейнеров были синтезированы образцы с различной структурой оболочки (таблица 1). Магнитные наночастицы размером 5 нм (рисунок 4) внедрялись в микроконтейнеры двумя способами: соосаждением при синтезе ядер ватерита и адсорбцией на оболочки (для некоторых образцов использовались оба способа, что показано ниже). Количество включённых в микрооболочки МНЧ оценивалось методом колориметрического титрования, при котором интенсивность окраски раствора соответствует концентрации ионов Fe^{3+} вследствие их взаимодействия с роданид-ионами (SCN^-).

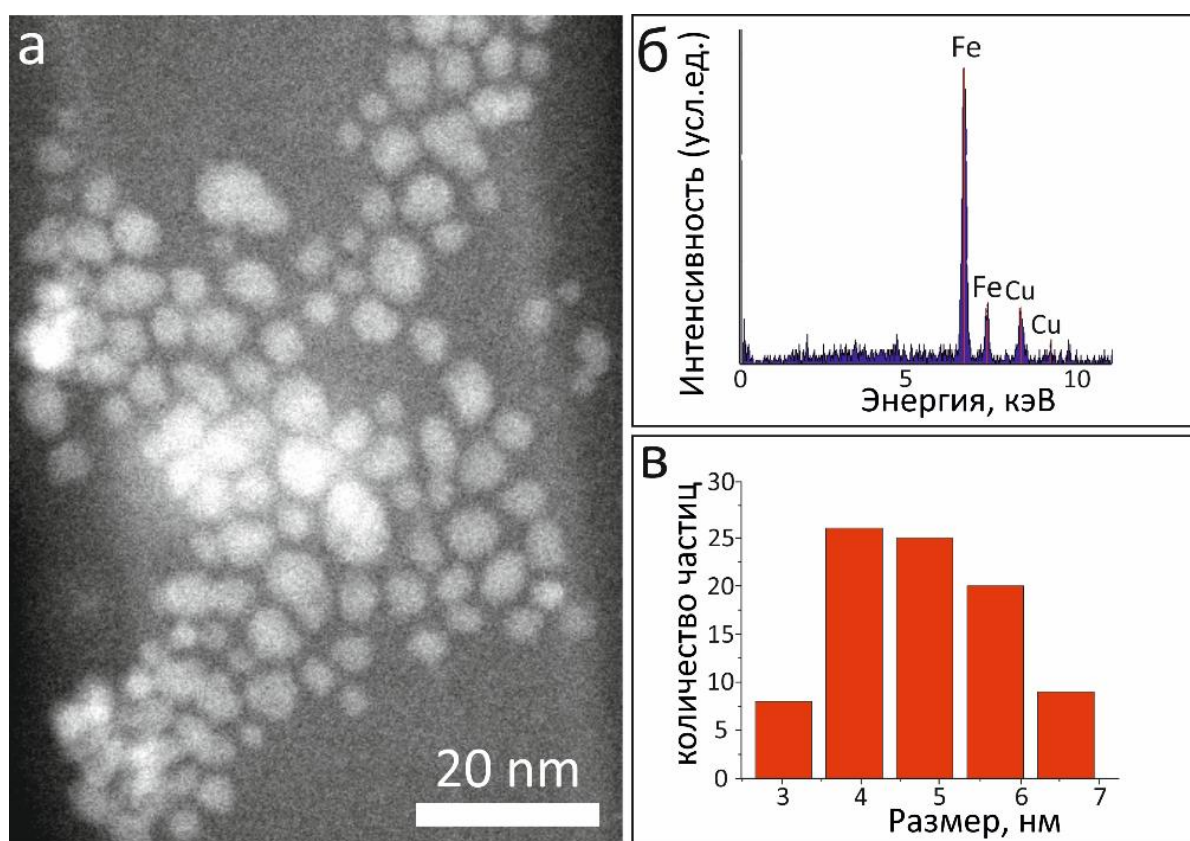


Рисунок 4 – Изображения наночастиц магнетита: (а) изображения, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопией (ПЭМ) высокого разрешения, (б) результаты энергодисперсионного рентгеновского анализа, (с) диаграммы распределения размеров, полученные с помощью программного обеспечения ImageJ на основе изображений, полученных с помощью ПЭМ.

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

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

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

При сборке микроконтейнеров проводили измерения ζ -потенциала (результаты измерений ζ -потенциала представлены в Таблице 2) методом динамического рассеяния света. ζ -потенциал микроконтейнеров после адсорбции всех слоев был отрицательным, что подтверждает химическое связывание между компонентами слоев.

Таблица 2 – ζ -потенциал после каждого этапа синтеза

Структура оболочки микроконтейнера	ζ – потенциал, мВ	Станд. откл., мВ ($\pm$)
Ядра CaCO_3	-2.31	0.8
$\text{CaCO}_3/\text{АЛГ}$	-19.6	6.4
$\text{CaCO}_3/\text{АЛГ}/(\text{раствор } \text{AgNO}_3)$	-26.2	1.3
$\text{АЛГ}/\text{Ag}^+$	-18.8	0.5
$\text{CaCO}_3/\text{МНЧ}$	-19.5	1.8
$\text{CaCO}_3/\text{МНЧ}/\text{АЛГ}$	-27.4	0.1
$\text{CaCO}_3/\text{АЛГ}/\text{МНЧ}/(\text{раствор } \text{AgNO}_3)$	-24.3	7.4

Отрицательный ζ -потенциал обусловлен присутствием карбоксильных групп на поверхности альгината, которые могут связываться с положительными ионами железа. При синтезе микроконтейнеров в кислой среде (pH 4–5) происходит частичное растворение магнетита, и высвобожденные ионы Fe^{3+} хелатируются карбоксильными группами альгината, формируя стабильные комплексы (Таблица 1).

Структура оболочки микроконтейнеров изучали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ/СТЭМ). Обнаружили, что размеры микроконтейнеров и скорость их агрегации увеличивались с количеством введенных МНЧ. Типичные ПЭМ/СТЭМ-изображения микроконтейнеров (образцы: № 0 – контрольный образец, без наночастиц магнита в оболочке/ядре и микроконтейнеры № 3- $\text{АЛГ}/\text{Ag}^+/\text{МНЧ}$ – представлены на рисунке 5. Данные СТЭМ, ПЭМ ВР и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС) указывают на присутствие частиц, содержащих магнитные наночастицы на поверхности наночастиц серебра (рисунок 5 в,г).

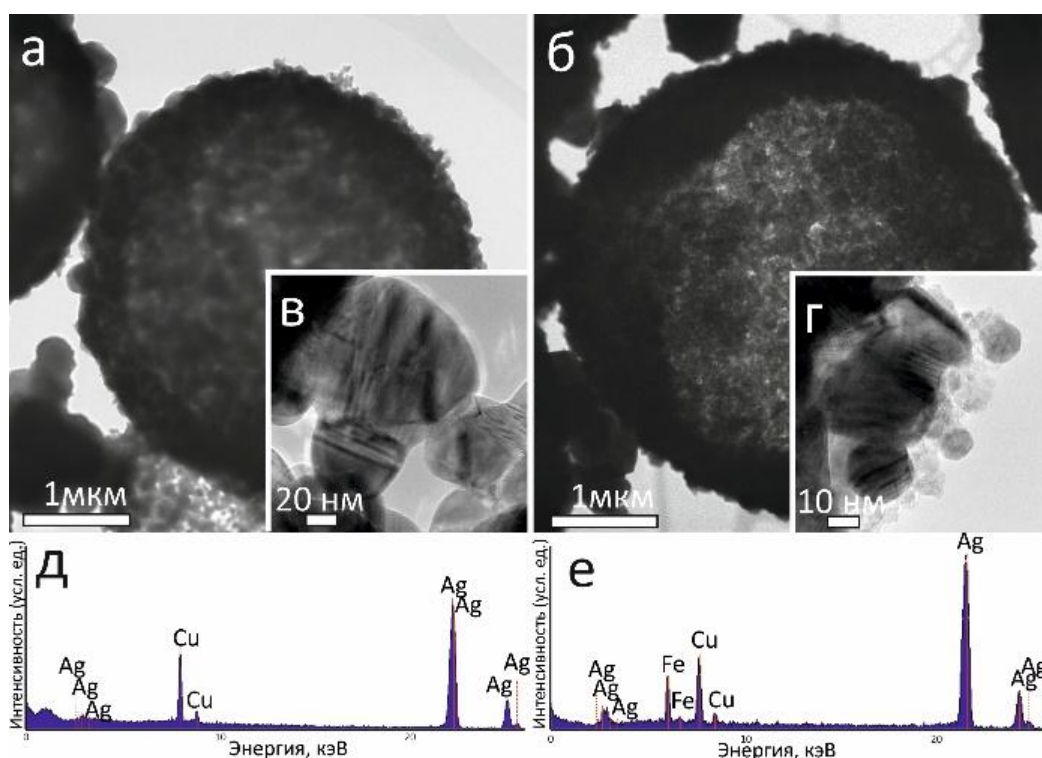


Рисунок 5 – Гибридные микроконтейнеры для образцов № 0 (а,в) и № 3 (б,д): (а,б) – изображение СПЭМ в светлом поле, (б,г) – изображения ПЭМ ВР.

Соответствующие результаты анализа ЭДС для обоих образцов представлены на панелях (д) и (е).

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

Для изучения влияния шаблона/ядра CaCO_3 на свойства полученных контейнеров, использовали частицы ватерита различных размеров, синтезированные тремя методами:

Во-первых, осуществлялся синтез с применением магнитного перемешивания [144], являющийся традиционным методом синтеза, где растворы прекурсоров смешиваются и перемешиваются с помощью магнитной мешалки. Данное перемешивание обеспечивает гомогенизацию реакционной смеси и более равномерное распределение центров нуклеации, что способствует «выравниванию» процесса роста частиц. В результате образуются частицы диаметром около 3 ± 2 мкм. Однако, полидисперсность такой системы остается значительной. Чем быстрее оба раствора будут равномерно распределены в рабочем объеме, тем большее число центров нуклеации сформируется, а значит, увеличится количество растущих микрочастиц CaCO_3 и уменьшается их средний размер. Использование ультразвуковой гомогенизации реакционной смеси позволило значительно уменьшить размер формирующихся частиц и их разброс.

Во-вторых, проводилось ультразвуковое перемешивание смеси [140]. В этом случае синтез происходит в присутствии ультразвуковых волн, которые создают кавитационные пузырьки и способствуют образованию микрочастиц со средним диаметром до 1,2 мкм [145] (в сравнении с механическим перемешиванием, при котором формируются полидисперсные микрочастицы карбоната кальция диаметром в несколько микрон), из-за комбинированного эффекта ультразвуковой кавитации и других факторов, таких как вязкость и диэлектрическая проницаемость. Ультразвуковые волны высокой интенсивности могут вызывать кавитацию в жидкости, что приводит к образованию и коллапсу кавитационных пузырьков [146]. Коллапс кавитационных пузырьков создает локальные области с высокой температурой и давлением, которые могут вызвать сдвиговые напряжения в жидкости [147]. Эти сдвиговые напряжения приводят к локальному снижению вязкости жидкости, что способствует более быстрому образованию частиц карбоната кальция. А также, коллапс кавитационных пузырьков генерирует ударные волны, которые могут приводить к поляризации молекул жидкости. Эта

поляризация может увеличивать диэлектрическую проницаемость жидкости в локальных областях [148].

Однако, стоит отметить, что изменения вязкости и диэлектрической проницаемости при стержневом ультразвуке зависят от нескольких факторов, включая частоту и интенсивность ультразвуковых волн, а также физико-химические свойства жидкости. В целом, стержневой ультразвук может вызывать как локальное снижение вязкости, так и увеличение диэлектрической проницаемости, что может влиять на скорость реакции и размер образующихся частиц [146].

И, в-третьих, использовался метод синтеза в растворе этиленгликоля [148]. Синтез в среде высоковязкого растворителя, такого как этиленгликоль, который замедляет рост кристаллов, создает благоприятные условия для формирования частиц ватерита размером менее микрона. Высокая вязкость этиленгликоля замедляет движение ионов и рост кристаллов карбоната кальция [149]. Низкая диэлектрическая проницаемость этиленгликоля затрудняет диссоциацию ионов, что приводит к более низкой концентрации ионов и образованию мелких кристаллов. Помимо этого, этиленгликоль может координироваться с ионами кальция и карбоната, предотвращая их агрегацию и рост [150,151].

Размеры полученных ядер ватерита составили $3,0 \pm 0,3$ мкм, $1,0 \pm 0,2$ мкм и $0,8 \pm 0,1$ мкм (рисунок 6 а–в). Размер ядер карбоната кальция играет ключевую роль в определении размеров получаемых альгинатных контейнеров, модифицированных наночастицами серебра. Данная зависимость позволяет осуществлять контроль размеров контейнеров на этапе синтеза, что в свою очередь важно для их функциональных характеристик (рисунок 6 г–е).

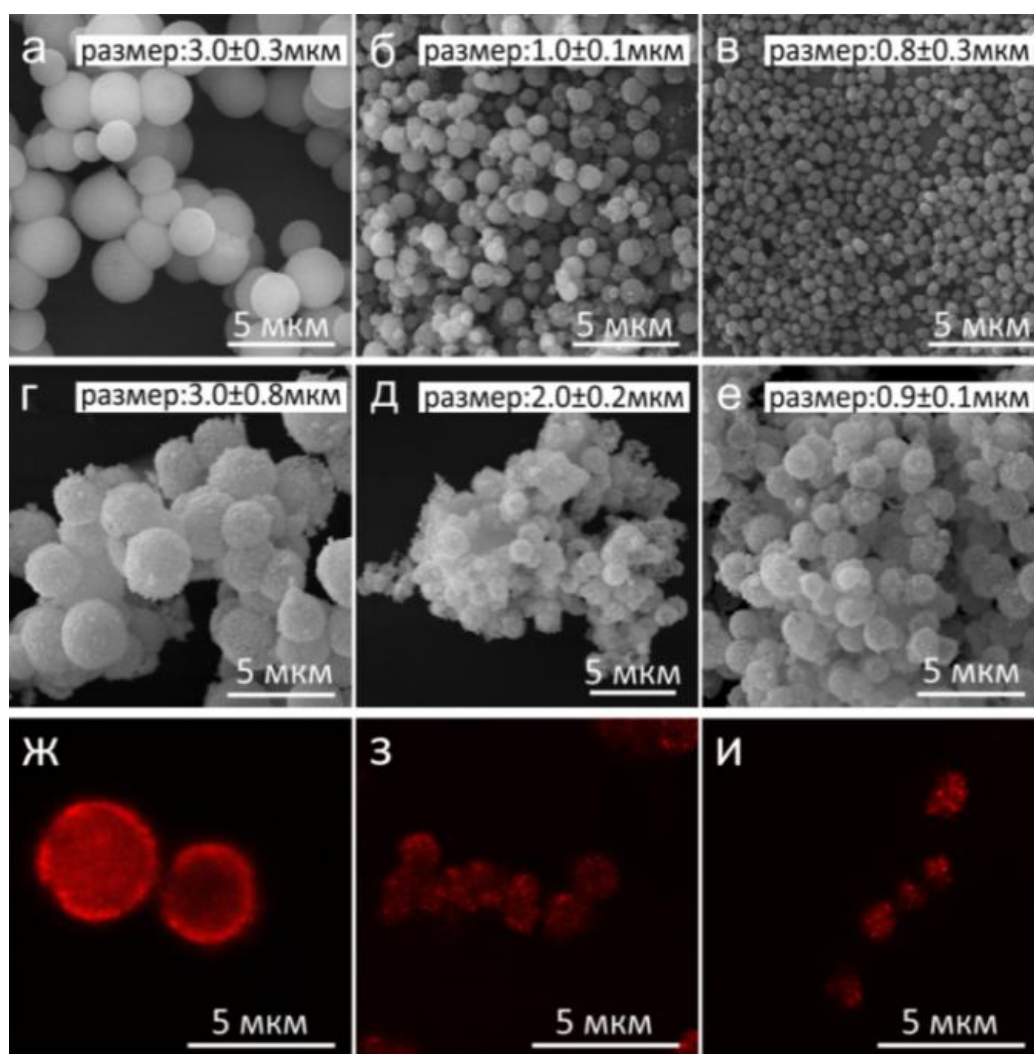


Рисунок 6 – Изображения СЭМ частиц CaCO_3 (а-в), синтезированных различными методами: при механическом перемешивании с помощью магнитной мешалки (а), при перемешивании с помощью ультразвука (б) и в среде этиленгликоля (в). Полые альгинатные контейнеры, синтезированные на основе соответствующего шаблона частиц CaCO_3 (г-е). Изображения контейнеров различных размеров, полученные методом конфокальной микроскопии (ж-и).

Для демонстрации эффективности и функциональности полученных микроконтейнеров, использованных в качестве носителей для доставки лекарственных средств, была проведена инкапсуляция бычьего сывороточного альбумина, конъюгированного с флуоресцентным красителем (ТРИЦ-БСА) (рисунок 6 ж-и, рисунок 7). Данное соединение было выбрано в качестве модельного объекта для исследования, что позволяет проанализировать процессы,

происходящие в контейнерах при инкапсуляции активных фармацевтических агентов.

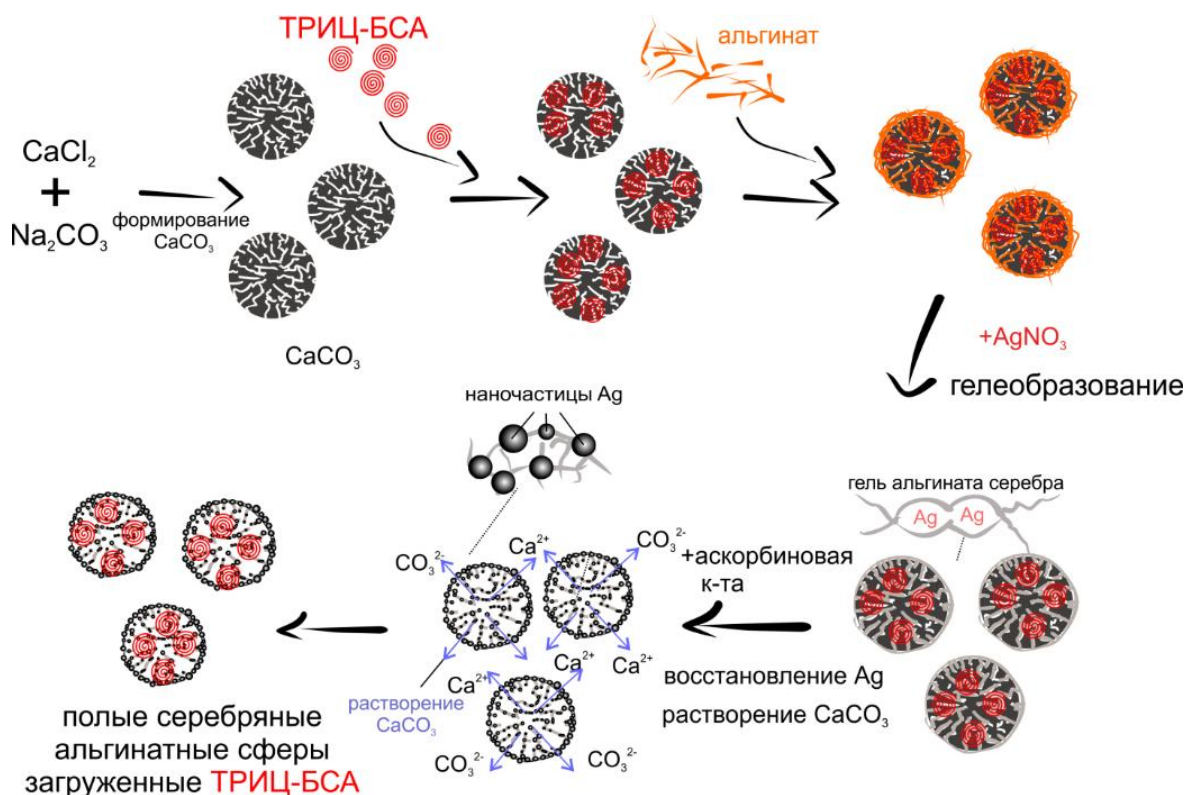


Рисунок 7 – Схема получения серебряных альгинатных микроконтейнеров.

Анализ структуры гибридной оболочки был осуществлён с использованием метода рентгеновской дифракции, который выявил наличие четырёх дифракционных пиков, соответствующих индексам (111), (200), (220) и (311). Это указывает на гранецентрированную кубическую решётку серебра (Ag) (рисунок 8 а). В рентгеновских спектрах контейнеров не было обнаружено CaCO_3 , что свидетельствует о полном растворении ватерита и, следовательно, о формировании поллой структуры на основе альгината серебра (рисунок 8 б).

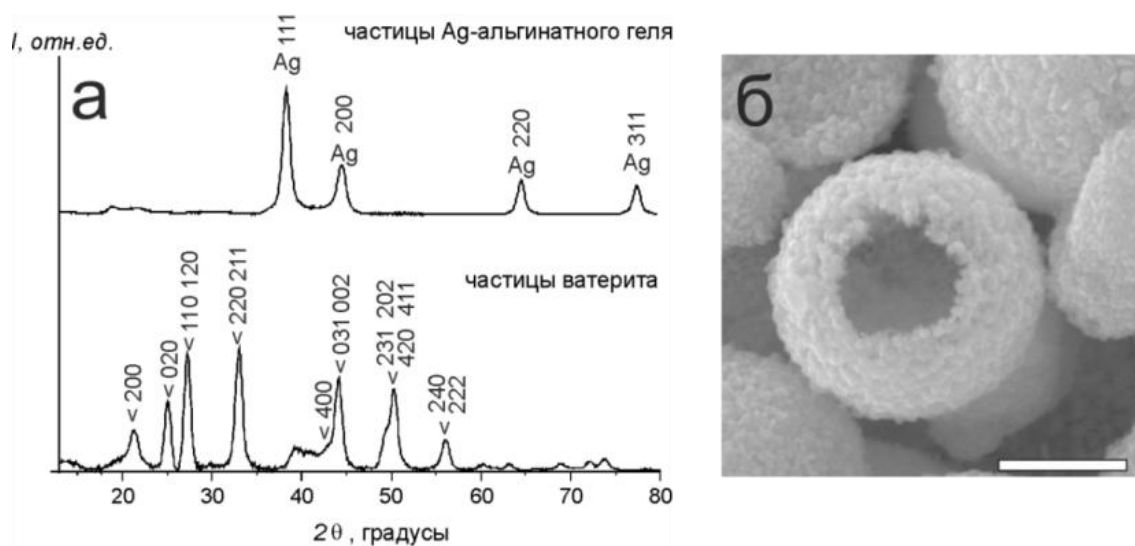


Рисунок 8 – Рентгенограмма гибридных контейнеров (сверху) и микрочастиц карбоната кальция (внизу) (а), пористая альгинатная серебряная структура (б).

Масштабная линейка соответствуют 1 мкм.

Изображения, полученные с помощью сканирующей просвечивающей электронной микроскопии (рисунок 9 а, б), демонстрируют, что в результате восстановления ионов серебра в альгинатной матрице формируются оболочки контейнеров, состоящие из альгината и наночастиц серебра. Средний размер и плотность наночастиц серебра, образующихся в альгинатной матрице, зависят от количества нитрата серебра, загруженного в ядра ватерита.

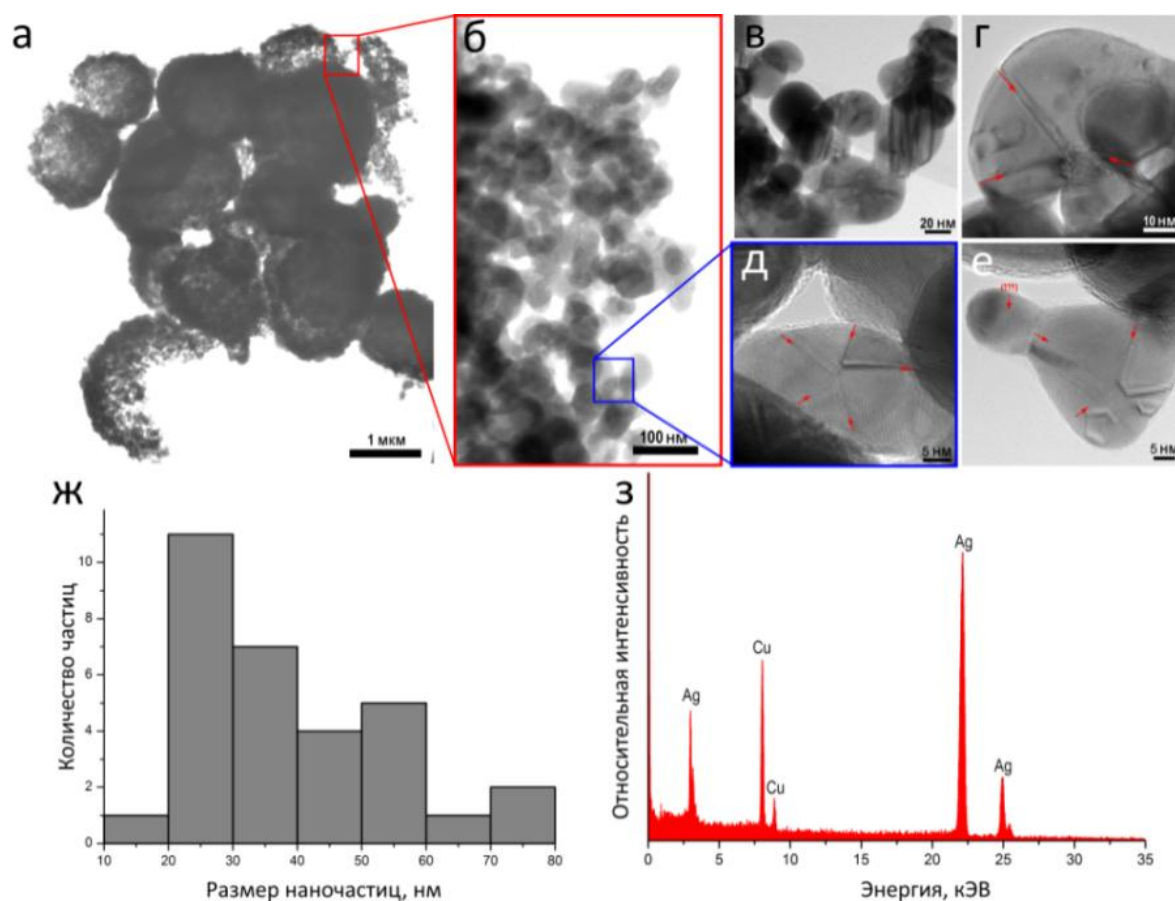


Рисунок 9 – Изображения СПЭМ контейнеров состоящих из альгината натрия и наночастиц серебра при различных увеличениях: обзорное светлопольное изображение полых контейнеров (а), увеличенное светлопольное изображение наночастиц серебра (б), Изображения просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения наночастиц серебра на оболочке контейнеров при различных увеличениях, красные стрелки указывают плоскости двойникования, параллельные плоскостям $\{111\}$ кристаллов (в – е), распределение наночастиц серебра по размерам (ж), оцененное по изображениям (б, в), результаты энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии контейнеров (з).

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

функцию микроконтейнеров [152]. При этом с увеличением концентрации нитрата серебра также возрастает скорость осаждения контейнеров, что связано с увеличением массы и плотности покрытия (рисунок 10).

В качестве оптимального количества нитрата серебра выбрали концентрацию 0,75 М, при которой средний размер наночастиц серебра в полученной гибридной оболочке составляет 35 ± 9 нм (рисунок 9 ж). При данной концентрации нитрата серебра обнаружили высокую плотность двойников (рисунок 9 г-е) в наночастицах, которые являются типичными дефектами наночастиц серебра [153] с гранецентрированной кубической решёткой {111}.

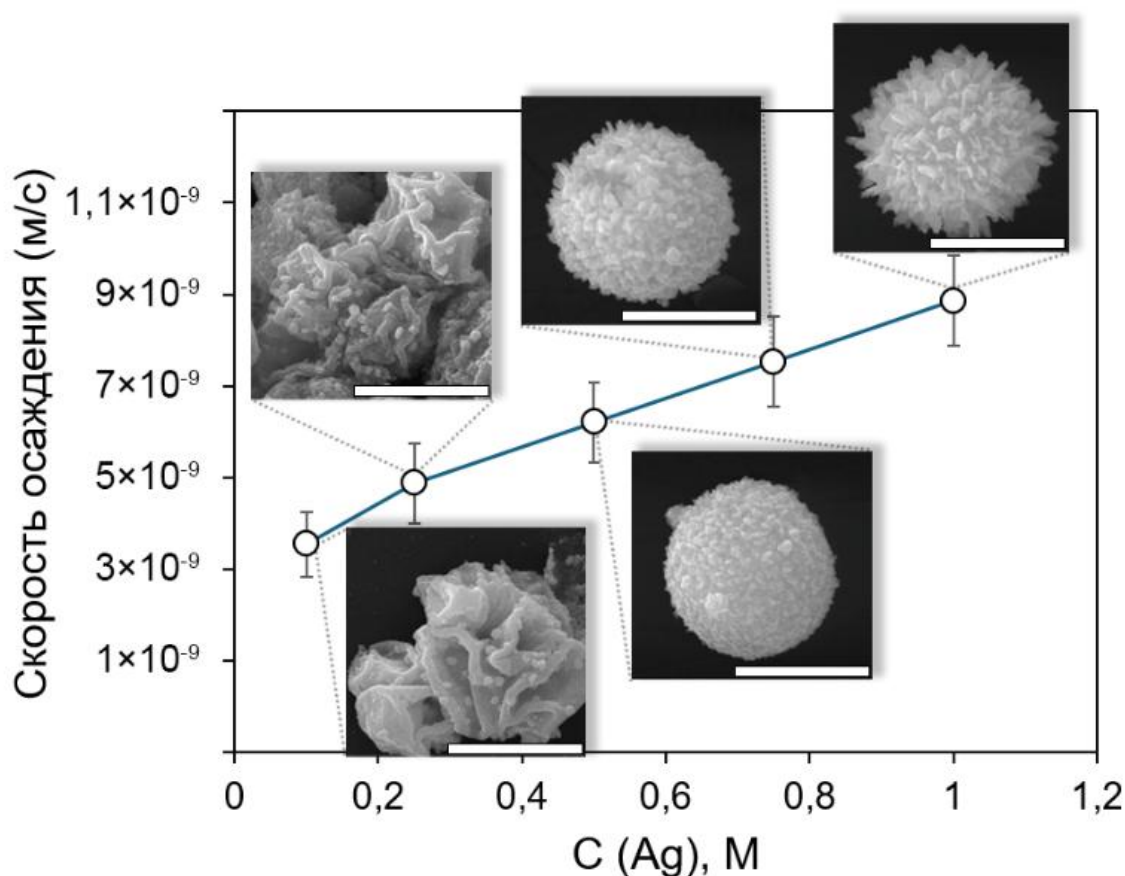


Рисунок 10 – Зависимость скорости осаждения микроконтейнеров в воде от концентрации нитрата серебра в шаблонных ядрах ватерита, шкала 3 мкм.

Исследование стабильности гибридных микроконтейнеров проводилось в условиях инкубации при физиологических условиях (PBS, 37 °C) в течение 24 часов. Результаты оценивались с помощью сканирующей электронной

микроскопии. Полученные СЭМ-изображения продемонстрировали сохранение структурной целостности, формы и размера микроконтейнеров, однако было зафиксировано явление агрегации микроконтейнеров (рисунок 11).

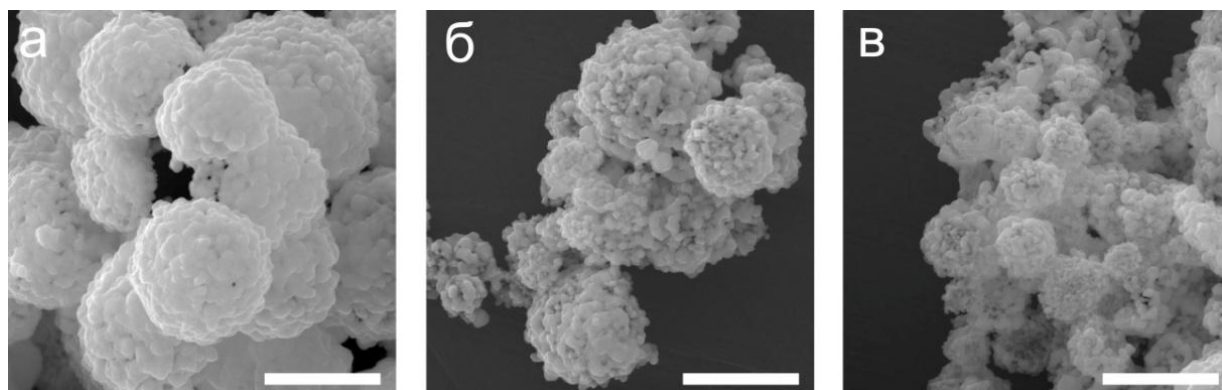


Рисунок 11 – Изображения сканирующей электронной микроскопии гибридных микроконтейнеров после 24 часов инкубации в буфере PBS при 37 °С:

(а) $3,0 \pm 0,8$ мкм; (б) $2,0 \pm 0,2$ мкм; (в) $0,9 \pm 0,1$ мкм. Масштабные линии соответствуют 2 мкм.

Были проведены измерения спектров комбинационного рассеяния для контейнеров различных размеров. Коэффициент усиления субстрата комбинационного рассеяния (SSEF) [154] определялся путем маркировки контейнеров 4-нитротиофенолом. Усредненные спектры комбинационного рассеяния 4-нитротиофенола на поверхности гибридных контейнерах показаны на рисунке 12.

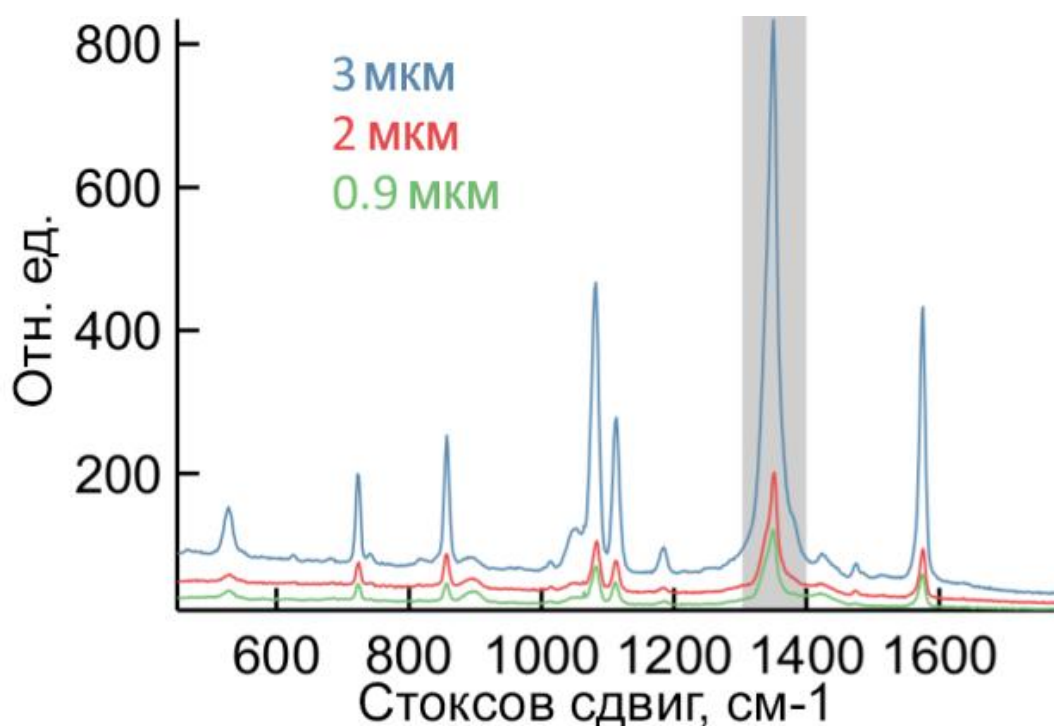


Рисунок 12 – Спектры комбинационного рассеяния 4-нитротиофенола, полученные с поверхности контейнеров различных размеров. Пик 1339 см^{-1} , используемый для расчета коэффициента усиления, выделен серым цветом.

Каждый спектр является средним по различным кластерам контейнеров.

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

$$\text{SSEF} = \frac{I_{\text{SERS}} P_{\text{Raman}}}{I_{\text{Raman}} P_{\text{SERS}}} \times \frac{N_{\text{Raman}}}{N_{\text{SERS}}} = \frac{I_{\text{SERS}} P_{\text{Raman}}}{I_{\text{Raman}} P_{\text{SERS}}} \times \frac{H_{\text{eff}}}{\rho \mu_{\text{Ag}}} \quad (5)$$

В данном случае интенсивности пересчитываются с учетом разницы в мощности накачки лазера при получении спектров (P_{Raman} и P_{SERS}). Эталонный спектр объемного раствора молекул измеряется в конфокальном объеме с эффективной высотой H_{eff} 160 мкм и концентрацией 3×10^{25} частиц/м³. Количество молекул, вносящих вклад в сигнал комбинационного рассеяния, определяется поверхностной плотностью молекул ρ , равной приблизительно $4,4 \times 10^{18}$ молекул на

м² [156], и площадью проекции поверхности серебряной оболочки μ_{Ag} , равной 2,8 мкм² (согласно изображениям, полученным с помощью микроскопа ПЭМ).

Данные комбинационного рассеяния анализируются на основе пика 1339 см⁻¹, после чего вычисляется коэффициент усиления в диапазоне 10⁴-10⁵ для всех типов микроконтейнеров (рисунок 13), который хорошо коррелирует с литературными данными [156].

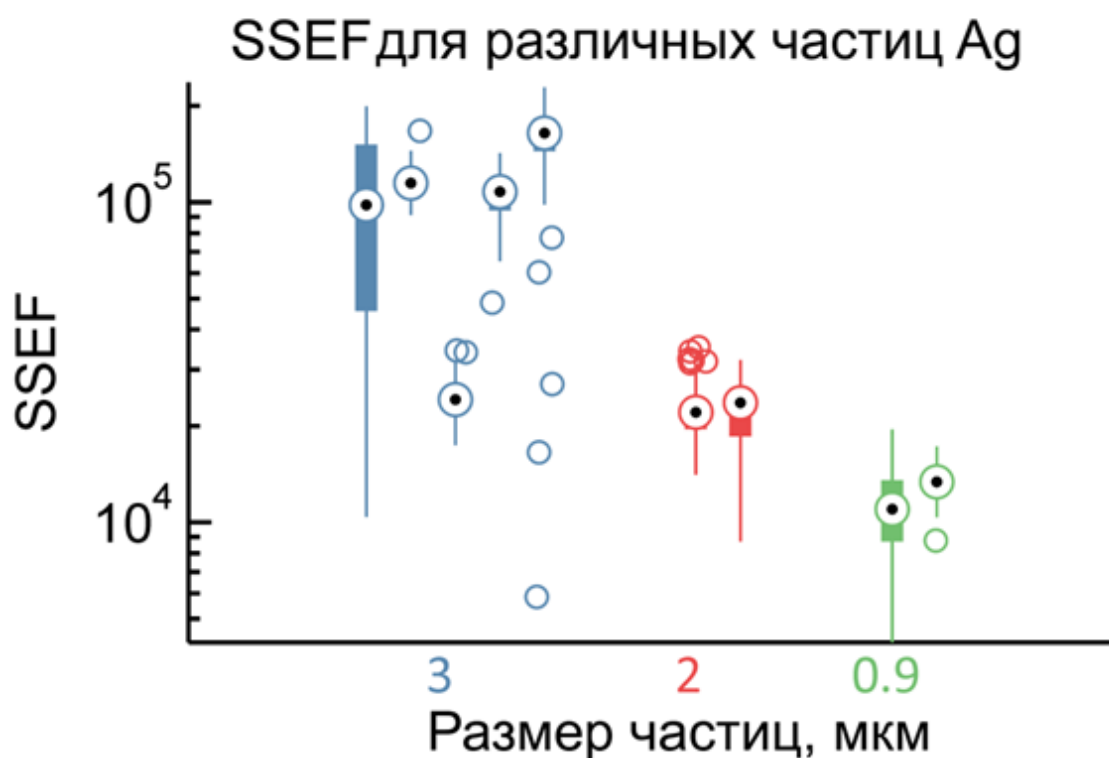


Рисунок 13 – SSEF, рассчитанный для контейнеров различного размера, показывающий значение 10⁴–10⁵. Каждый столбец представляет несколько точек, измеренных на отдельном кластере микроконтейнеров.

Достаточно большой разброс коэффициентов усиления можно объяснить неоднородными, самособирающимися агрегатами/кластерами микроконтейнеров, на которых были получены спектры комбинационного рассеяния. Для каждого набора микроконтейнеров спектры комбинационного рассеяния были получены, по меньшей мере, в двух картах размером 40 × 40 мкм с разрешением 10 × 10 пикселей.

Микроконтейнеры размером $3,0 \pm 0,8$ мкм проявляют самое высокое изменение коэффициента усиления в сравнении с микроконтейнерами других размеров. Это объясняется более равномерным распределением наночастиц серебра в наиболее крупных альгинатных контейнерах, что обеспечивает оптимальное расстояние между наночастицами серебра. Но увеличение количества областей неоднородности, характерных для наиболее крупных частиц, приводит к увеличению дисперсии сигнала комбинационного рассеяния. Использование ионов серебра в качестве структурных элементов для наночастиц серебра, полученных с помощью синтеза *in situ* на поверхности альгинатных контейнеров, позволяет получать контейнеры с однородным распределением наночастиц серебра в их оболочках, а также достигать оптимального расстояния между наночастицами серебра, что позволяет усилить сигнал комбинационного рассеяния света до 10^5 [157].

Разработан способ темплатного синтеза микроконтейнеров с контролируемым размером и заданными свойствами оболочки, включающий одновременное формирование альгинатной матрицы и *in situ* синтез наночастиц серебра. Установлено, что концентрация нитрата серебра существенно влияет на морфологию, плотность и размер наночастиц, а также на усиление сигнала комбинационного рассеяния света. Оптимальные условия (0,75 М нитрата серебра) обеспечивают формирование наночастиц с высокой плотностью двойников и максимальное усиление сигнала. Показана зависимость эффективности адсорбции магнитных наночастиц и константы десорбции модельного конъюгата от состава и структуры микроконтейнеров, что позволяет целенаправленно регулировать их функциональные характеристики для различных задач.

На следующем этапе исследования было проанализировано влияние синтезированных в альгинатной матрице серебряных наночастиц на эффект комбинационного рассеяния света, применяемого для детектирования веществ в суспензии. В качестве модельного объекта был использован краситель Родамин-Б ($C_{28}H_{31}O_3N_2Cl$), а также была проведена оценка его обнаружения в среде с бактериями *Escherichia coli* с использованием данного эффекта. Высокая

концентрация наночастиц серебра в альгинатных контейнерах обеспечила возможность обнаружения флуоресцентного красителя Родамин-Б путем регистрации спектров комбинационного рассеяния света на поверхности микроконтейнеров размером 3 мкм. Перед получением спектров комбинационного рассеяния света (ГКР) Родамин-Б был растворен в воде при следующих концентрациях: 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-8} и 10^{-9} М. На рисунке 14 представлены спектры Родамина-Б (10^{-3} М) и контейнеров без красителя, полученные с поверхности серебряных альгинатных микроконтейнеров. Все спектры ГКР были получены с использованием лазера с длиной волны 785 нм и мощностью 0,03 МВт, при этом было проведено минимум десять измерений с поверхности микроконтейнеров. Интенсивные пики, наблюдаемые на 1358 см^{-1} , 1507 см^{-1} , 1530 см^{-1} и 1648 см^{-1} , соответствуют спектру красителя Родамин-Б.

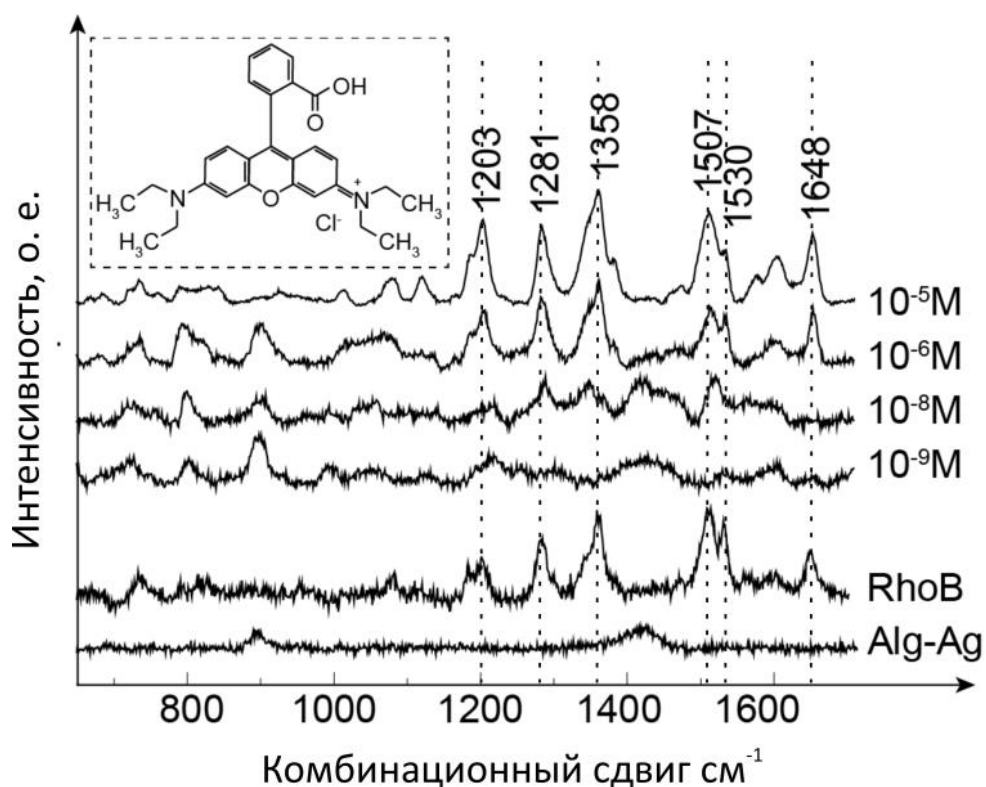


Рисунок 14 – Спектры ГКР, полученные с поверхности серебряных альгинатных контейнеров (Alg-Ag).

Обнаружено, что гибридные микроконтейнеры обеспечивают значительное усиление сигнала комбинационного рассеяния света благодаря наличию

наночастиц серебра в их составе. Это свойство позволяет системе демонстрировать высокую чувствительность даже к низким концентрациям красителя, что подтверждается получением ГКР-сигнала для Родамина-Б при концентрации 10^{-8} М. В образце с высоким содержанием Родамина-Б также наблюдаются пики альгината, которые не перекрываются с пиками красителя в области 1200 см^{-1} и 1600 см^{-1} . Важно отметить, что в спектрах ГКР отсутствуют пики CaCO_3 , что свидетельствует о полном удалении ядер ватерита из образца. Для оценки практического применения разработанной структуры в качестве диагностического средства были проведены эксперименты по обнаружению микроорганизмов в растворе, используя модельные бактерии кишечной палочки (*E. coli*). Спектры ГКР, демонстрирующие химическую сигнатуру бактерий, представлены на рисунке 6а. Полученные спектры ГКР для штаммов *E. coli* соответствуют ранее показанным спектрам комбинационного рассеяния света [158], что подтверждает эффективность предложенного метода для диагностики и обнаружения микроорганизмов.

Два интенсивных пика при 733 см^{-1} и 1334 см^{-1} могут быть связаны с производными флавина или другими молекулами, содержащими аденин. Пик при 1373 см^{-1} указывает на присутствие молекул ДНК, в то время как пик при 625 см^{-1} относится к химическим группам COO^- . Пик при 1450 см^{-1} обусловлен наличием липидов.

Суспендирование гибридных микроконтейнеров вместе с бактериями *E. coli* может приводить к их взаимодействию и связыванию, что позволяет бактериям соединяться с несколькими микроконтейнерами одновременно. Связь между бактериями и микроконтейнерами обусловлена пористой структурой оболочки микроконтейнеров, что создает благоприятные условия для адсорбции бактерий. Эти факторы могут способствовать быстрому определению бактерий по их химическим сигнатурам без необходимости использования каких-либо меток. Кроме того, карта интенсивности комбинационного рассеяния света на пике 733 см^{-1} демонстрирует наличие сигнатур аденина на поверхности бактерий, что подтверждается данными, представленными на рисунке 15 б.

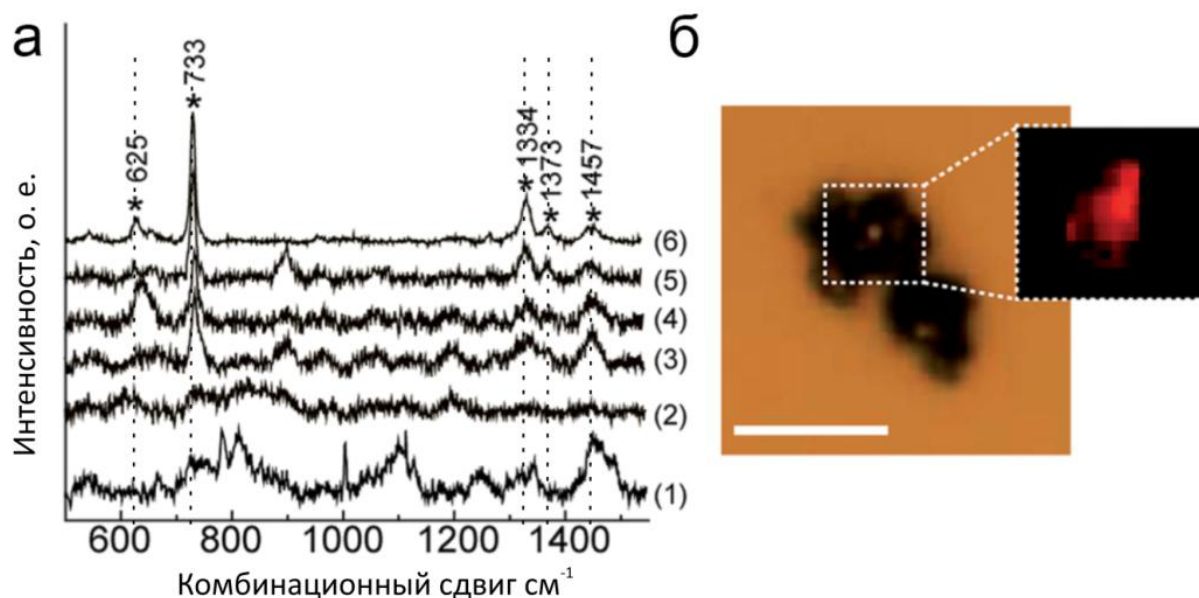


Рисунок 15 – Спектры ГКР модельных бактерий штамма *E. coli*, полученные в присутствии микроконтейнеров (спектры (3)-(6)) (а); контрольный спектр комбинационного рассеяния *E. coli* (1); спектр (2) соответствует комбинационному рассеянию гибридных контейнеров в фосфатно-солевом буферном растворе; Оптическое изображение гибридных микроконтейнеров (б). Вставка показывает карту интенсивности комбинационного рассеяния (полученную на длине волны 733 см^{-1}) серебряного альгинатного микроконтейнера (пунктирная линия показывает отснятый участок). Масштабная линейка соответствуют 10 мкм.

Синтез наночастиц серебра *in situ* в альгинатной матрице оболочки микроконтейнеров привёл к усилению комбинационного рассеяния света на их поверхности. Это позволило детектировать методом КР-спектроскопии модельный зонд — Родамин Б в водном растворе в диапазоне концентраций от 0,01 до 1000 мкМ.

ГЛАВА 4. Исследование влияния состава и структуры оболочки микроконтейнеров на десорбцию инкапсулированных молекул конъюгата ТРИЦ-БСА с помощью маломощной ультразвуковой стимуляции.

В данной главе диссертационного исследования рассматривается влияние состава и структуры альгинатной оболочки микроконтейнеров на десорбцию модельного соединения при воздействии маломощной ультразвуковой стимуляции. Поскольку ультразвуковая стимуляция является неинвазивным и не разрушающим методом, она может быть использована для контролируемого высвобождения лекарственных средств и других соединений.

Исследовали кинетику разрушения контейнеров с целью десорбции конъюгата при помощи ультразвуковой ванны в течение различных промежутков времени (от 1 до 180 минут) на частоте 35 кГц и плотности мощности 0,64 Вт/см². Исследовали два параметра в зависимости от размера шаблона ядер ватерита, использованного для синтеза гибридных микроконтейнеров:

(1) доля десорбированных молекул конъюгата ТРИЦ-БСА в надосадочной жидкости;

(2) процент разрушенных контейнеров.

Для оценки влияния ультразвукового воздействия на образцы, сравнивали контейнеры, подверженные ультразвуковому воздействию и контрольные микроконтейнеры, без ультразвукового воздействия (в качестве контрольного образца была взята суспензия контейнеров размером 3.0 ± 0.8 мкм). Контрольная суспензия контейнеров была стабильна в течение 3 ч, десорбция флуоресцентного конъюгата ТРИЦ-БСА составила не более 6% с константой скорости десорбции 0,0136 ч⁻¹. Такая кинетика соответствует самопроизвольной десорбции молекул конъюгата через гибридные оболочки (рисунок 16).

Измерения концентрации молекул конъюгата ТРИЦ-БСА в надосадочной жидкости показали, что УЗ-воздействие приводит не только к разрушению

контейнеров, но и повышению скорости десорбции молекул конъюгата ТРИЦ-БСА. В этом случае, выход инкапсулированных молекул конъюгата ТРИЦ-БСА при ультразвуковом воздействии на суспензию гибридных микроконтейнеров размером 3.0 ± 0.8 мкм составил 18% от общей массы инкапсулированного в образце конъюгата, что соответствует 20% разрушенных контейнеров. В течение 3 часов УЗ-воздействия число разрушенных контейнеров составило 99%. Однако, количество десорбированных молекул флуоресцентного конъюгата в надосадочной жидкости не увеличивается, потому что эксперимент проводился в объеме 1 мл, и высвободившийся конъюгат адсорбировался обратно на кусочки разрушенных оболочек микроконтейнеров (рисунок 16).

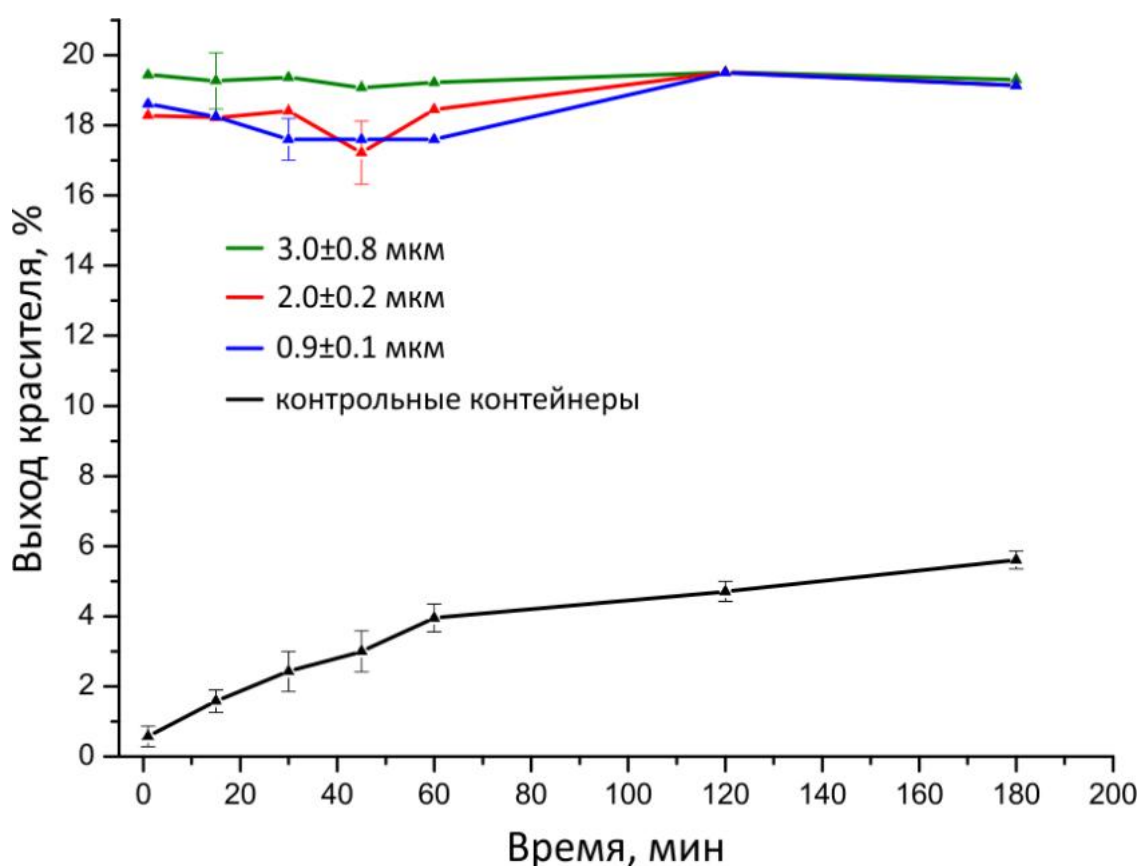


Рисунок 16 – Зависимость десорбции инкапсулированных молекул конъюгата ТРИЦ-БСА от времени воздействия ультразвука.

Короткое время воздействия УЗ (менее 10 мин) не приводило к значительным морфологическим изменениям оболочек микроконтейнеров в суспензии. Морфологические изменения, обусловленные воздействием ультразвука, в

суспензиях микроконтейнеров размером 3.0 ± 0.8 мкм выше, чем в суспензиях микроконтейнеров меньших размеров (2.0 ± 0.2 и 0.9 ± 0.1 мкм), что указывало на более высокую устойчивость таких микроконтейнеров к действию ультразвука. После 30 минут УЗ-воздействия образцы с наибольшим размером были полностью разрушены (рисунок 17 а).

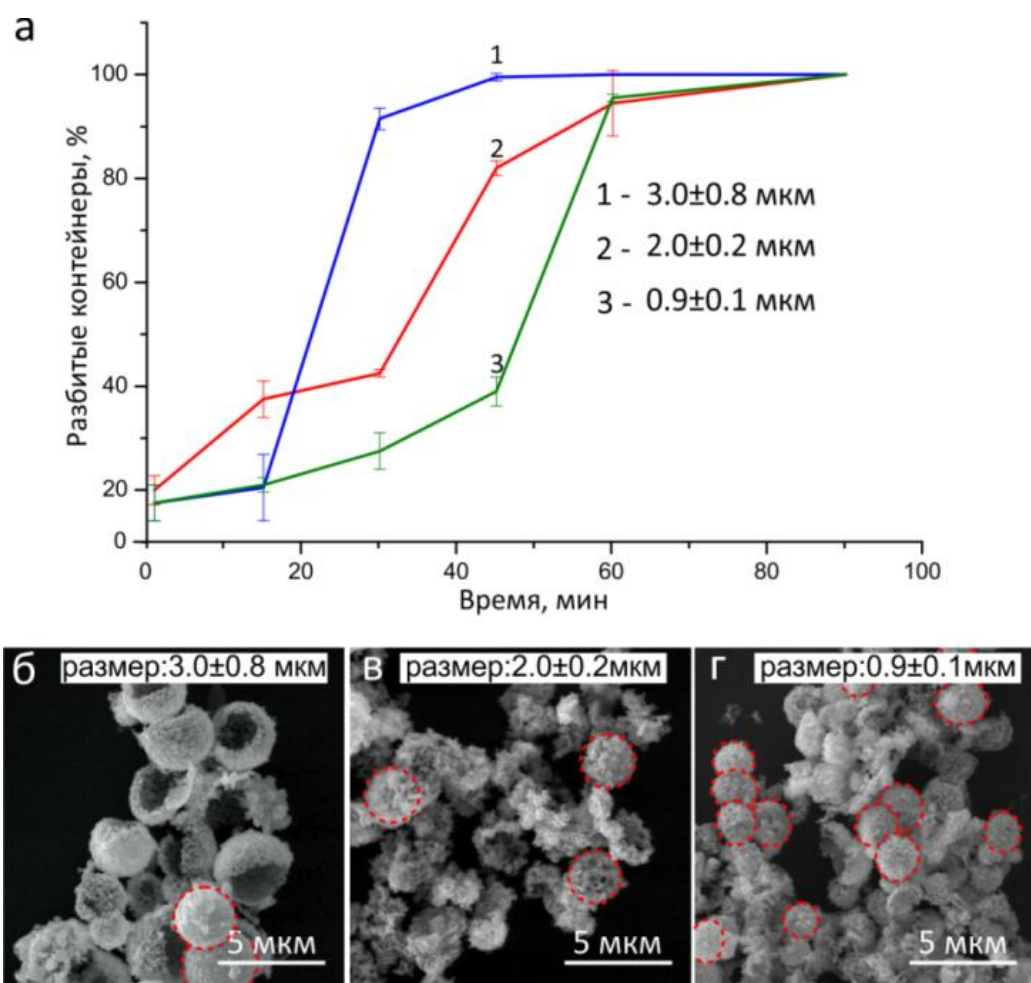


Рисунок 17 – Зависимость количества разрушенных контейнеров различных размеров (1) $3,0 \pm 0,8$ мкм, (2) $2,0 \pm 0,2$ мкм, и (3) $0,9 \pm 0,1$ мкм от времени ультразвуковой обработки (частота 35 кГц и плотность мощности $0,64 \text{ Вт/см}^2$) (а).

Изображения, полученные методом СЭМ, полых серебряных альгинатных контейнеров различных размеров (б-г): $3,0 \pm 0,8$ мкм (б), $2,0 \pm 0,2$ мкм (в) и $0,9 \pm 0,1$ мкм (г) после ультразвукового воздействия. Длительность процедуры составляет 60 мин. Красными пунктирными линиями обозначены контейнеры, не подвергавшиеся ультразвуковому воздействию.

Высокая подверженность микроконтейнеров размера 3.0 ± 0.8 мкм к действию ультразвукового излучения может быть объяснена высокой неоднородностью их оболочки. При добавлении аскорбиновой кислоты во время синтеза, происходило истончение оболочки контейнеров, что приводило к разрыву самого тонкого участка стенки и быстрому разрушению контейнера при УЗ-воздействии (рисунок 17 б). Количество разрушенных контейнеров различных размеров представлены в таблица 3.

Таблица 3 – Зависимость количества разбитых микроконтейнеров в зависимости от времени ультразвуковой обработки

% разбитых микроконтейнеров					
Время, мин Размер, мкм	1	15	30	45	60
3.0 ± 0.8	18	85	96	99	99
2.0 ± 0.2	20	37	43	79	92
0.9 ± 0.1	16	19	25	37	95

Гибридные микроконтейнеры размером $0,9 \pm 0,1$ мкм устойчивы к ультразвуковому воздействию благодаря равномерному покрытию альгинатной оболочки наночастицами серебром (рисунок 17 г).

Таким образом, исследования физико-химических свойств полученных микроконтейнеров показало, что воздействие ультразвука в течение 60 минут (35 кГц, $0,64$ Вт/см²) на суспензии альгинатных микроконтейнеров, модифицированных наночастицами серебра, приводит к разрушению оболочек и десорбции инкапсулированного модельного конъюгата ТРИЦ-БСА. Эффективность этого процесса зависит от размера микроконтейнеров.

ГЛАВА 5. Исследование влияния состава и структуры альгинатных микроконтейнеров на кинетику высвобождения загруженного соединения под действием лазерного излучения в условиях *in vivo* на примере многоклеточных живых организмов (*C. elegans*).

В данной главе продемонстрировано применение дистанционного высвобождения флуоресцентного конъюгата ТРИЦ-БСА в нематоде *Caenorhabditis elegans* с использованием лазерного света в ближнем инфракрасном диапазоне в качестве триггера. Для этих целей были разработаны гибридные микроконтейнеры, функционализированные наночастицами серебра и выбран оптимальный размер носителей, предназначенных для визуализации в условиях *in vivo* и обеспечения их проникновения в биологические системы, с использованием нематоды *C. elegans*. Разработанный тип гидрогелевых микроконтейнеров отличается способностью к длительному хранению в лиофилизированном состоянии, что позволяет нематодам поглощать микроконтейнеры в стандартных условиях культивирования на воздухе [12].

1.1 Приготовление культуры *C. elegans*

Нематоды выращивали в соответствии со стандартным протоколом [159]: штамм N₂ линии дикого типа культивировали на чашках Петри с питательной средой для роста нематод, засеянной штаммом грамотрицательными палочковидными бактерия (*Escherichia coli* OP50) в качестве источника пищи. Планшеты инкубировали при температуре 20 °C.

1.2 Подготовка к интернализации гибридных микроконтейнеров *in vivo* нематодами *C.elegans*.

Данная диссертационная глава посвящена исследованию влияния состава и структуры альгинатных микроконтейнеров на десорбцию загруженных молекул конъюгата ТРИЦ-БСА под действием лазерного излучения в условиях *in vivo* на примере многоклеточных живых организмов *C. elegans*.

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

Полученные флуоресцентные микроконтейнеры объемом 0,1 мл концентрацией 20 мг/мл смешивали с суспензией бактерий (*E. coli* OP50) объемом 0,1 мл и инкубировали с ранее подготовленной культурой *C. elegans* в течение 12 часов. После этого нематоды были обездвижены с использованием S-basal (50 мМ фосфата калия; 100 мМ хлорида натрия, pH 6), с добавлением Левамизола в концентрации 10 мМ

Интернализацию микроконтейнеров нематодами исследовали с помощью флуоресцентной, конфокальной микроскопиями и дифференциальной интерференционной контрастной микроскопии Номарского. Движение *C.elegans* до и после проведения эксперимента использовалось в качестве окончательного теста на жизнеспособность.

Схематичное изображение эксперимента представлено на рисунке 18.

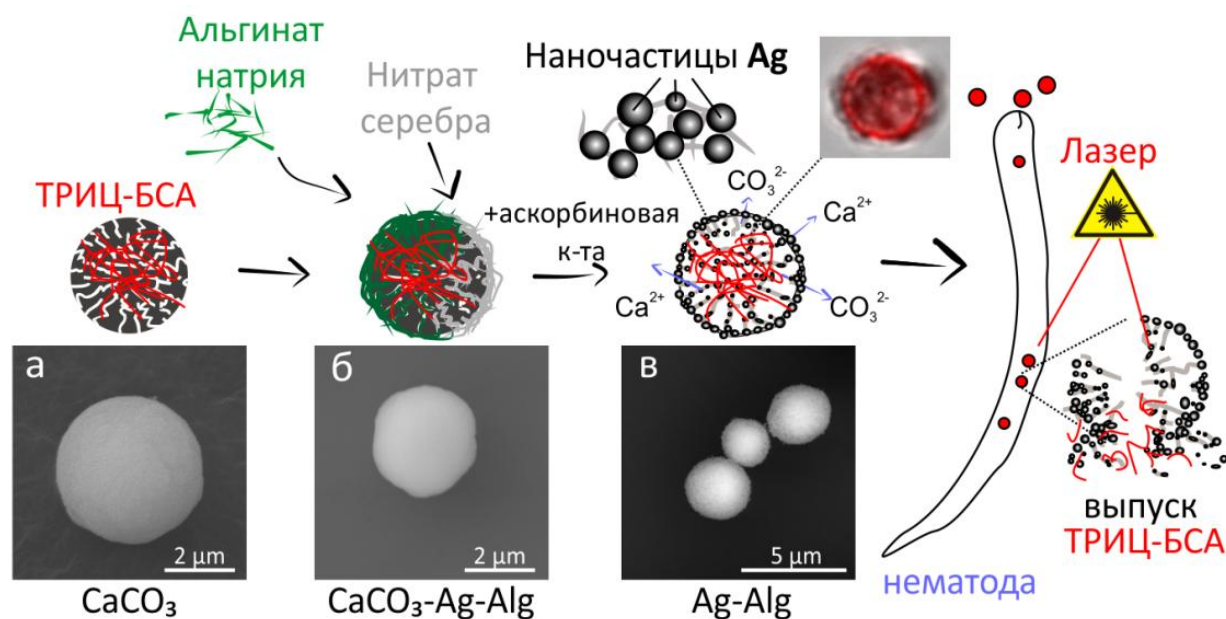


Рисунок 18 – Схема этапов синтеза multifunctional microcontainers с последующим лазерным индуцированным высвобождением молекул ТРИЦ-БСА внутри нематоды.

1.3 Лазерно-индуцированное высвобождение красителя, исследования флуоресцентной микроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния

Исследования флуоресцентной микроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния проводились с использованием самодельной установки, аналогичной описанной ранее [124], в сочетании с флуоресцентным микроскопом.

1.4 Изучение влияния лазерного облучения на процессы десорбции инкапсулированного в микроконтейнеры конъюгата ТРИЦ-БСА *in vitro*

Для изучения влияния лазерного облучения на процессы высвобождения, инкапсулированного конъюгата ТРИЦ-БСА из микроконтейнеров, а также на взаимодействие с окружающими биологическими объектами, на поверхность агар-агара было помещено 5 мл суспензии флуоресцентных микроконтейнеров концентрацией 50 мкг/мл. Образцы подвергали воздействию лазерного излучения с длиной волны 785 нм в течение 10 сек с выходной мощностью, варьирующей от 5 до 15 мВт на микроконтейнеры. Эффект лазерного воздействия анализировался с помощью флуоресцентной оптической микроскопии, а полученные микрофотографии впоследствии обрабатывались с использованием программного обеспечения ImageJ. Сравнение изображений до и после лазерного облучения позволило построить соответствующие профили флуоресценции и интенсивности пропускания микроконтейнеров (рисунок 19).

Светлопольная микроскопия выявила различия в размерах «ударных кратеров», т.е. углублений, появившихся на пластине с агар-агаром после воздействия импульсов лазера мощностью 5 мВт (размер ударного кратера составил 25 мкм) и 15 мВт (размер ударного кратера составил 39 мкм). Эффект образования кратеров может быть объяснен нагреванием агар-агара посредством теплообмена через микроконтейнер, при чем этот эффект усиливается при более высокой мощности лазера. На основе уменьшения интенсивности сигнала флуоресценции (красная линия, рисунок 19 е, м) было сделано предположение, что мощности 5 мВт и 15 мВт удовлетворяют необходимые и достаточные условия для высвобождения инкапсулированного модельного вещества [12].

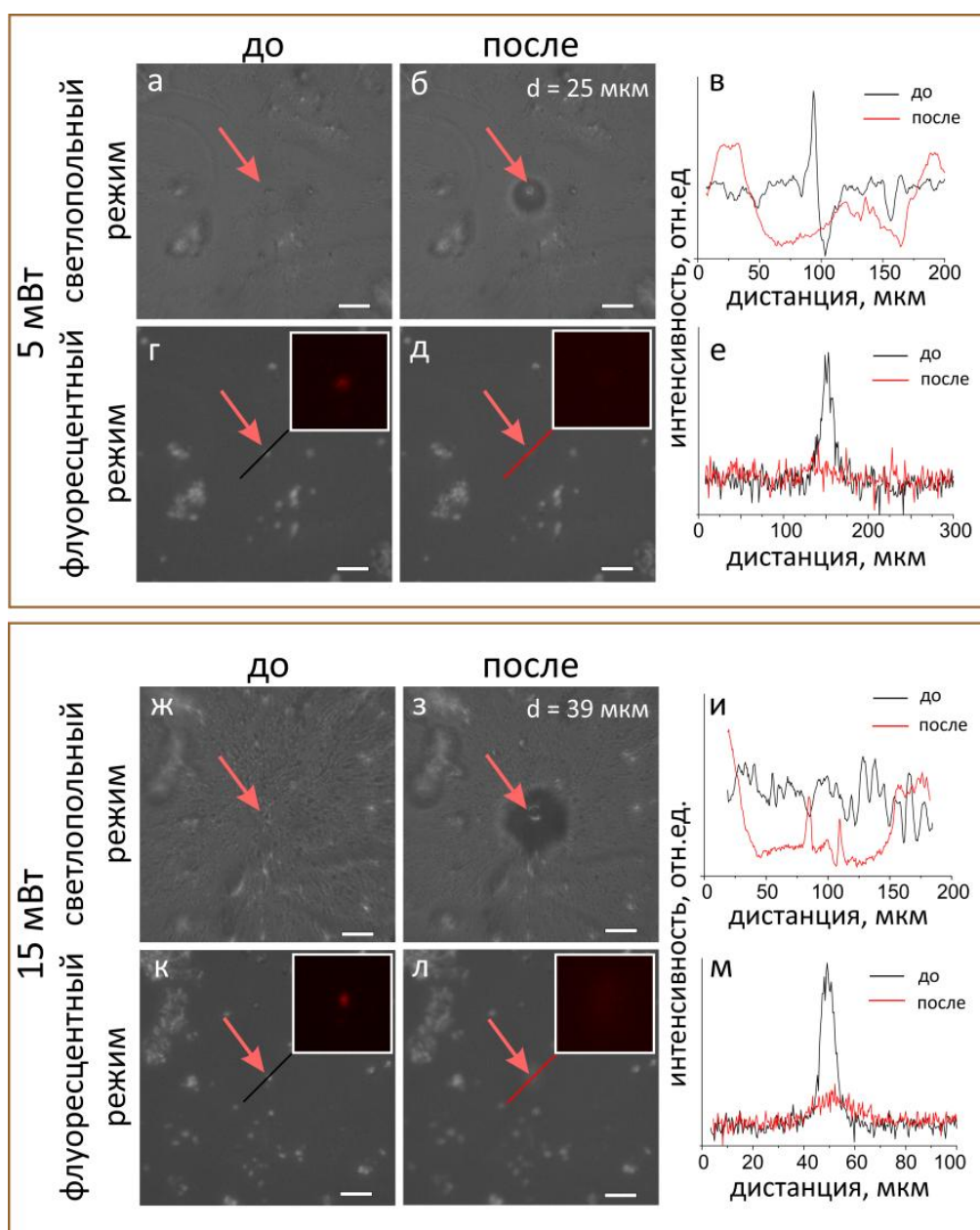


Рисунок 19 – Изображения в режимах светлой (а, б, ж, з) и флуоресцентной (г, д, к, л) микроскопии контейнеров на пластине агар-агара до (а, б, ж, к) и после (и, д, з, л) обработки лазером, с интенсивностями 5 мВт и 15 мВт, соответственно. Соответствующие профили вдоль линий, изображенных в (г, д, к, л), представлены в (в, е, и, м). Масштабные линейки соответствуют 20 мкм.

На основании исследования физико-химических свойств полученных микроконтейнеров установлено, что воздействие электромагнитного излучения в ближней инфракрасной области спектра (что показано на длине волны 785 нм)

приводит к нарушению целостности их оболочек. Это использовано для индуцирования высвобождения, инкапсулированного в них конъюгата воздействием ИК-лазера.

1.5 Изучение влияния лазерного облучения на процессы высвобождения, инкапсулированного в микроконтейнеры вещества *in vivo*.

Для изучения процесса высвобождения флуоресцентного конъюгата ТРИЦ-БСА *in vivo*, инкапсулированного в микроконтейнеры, нематоды *C. elegans* подвергали воздействию инфракрасного лазера с мощностью от 5 до 15 мВт после 24 часов интернализации микроконтейнеров. Флуоресцентный и светлопольный микроскопические анализы проводились параллельно как до, так и после лазерного облучения. Полученные изображения анализировались с использованием программного обеспечения ImageJ.

Вся постлучевая визуализация, включая анализ профиля интенсивности флуоресценции, выполнялась сразу после проведения лазерного воздействия. Жизнеспособность *C. elegans* оценивалась по наблюдению за движением червей до и после облучения.

В целях демонстрации принципа лазерного индуцированного высвобождения конъюгата ТРИЦ-БСА из гибридных микроконтейнеров *in vivo* использовались нематоды *C. elegans*, что обусловлено их значением в нейробиологических и геномных исследованиях. Система фильтрации *C. elegans* обеспечивает захват небольших количеств микробной суспензии при каждом цикле глотания, одновременно выбрасывая жидкость и сохраняя бактерии, которые далее транспортируются в кишечник [159]. Однако, данная стратегия питания ограничивает возможность массового контролируемого потребления различных солубилизированных соединений, хотя само поглощение действительно происходит. Для повышения скорости абсорбции можно применять соединения,

иммобилизованные в микроконтейнеры, размеры которых соответствуют ротовому отверстию *C. elegans*. Примером служат липосомы, содержащие гидрофильный флуоресцентный краситель уранина, использованные для тестирования перорального введения водорастворимых веществ у *C. elegans* [160]. Прием внутрь флуоресцентного красителя, иммобилизованного в липосомах, обеспечил успешную пероральную доставку химических веществ в кишечник нематод. *C. elegans* является стандартным модельным организмом благодаря своей простоте и удобству визуализации с применением оптической микроскопии. Его прозрачность также делает нематоды подходящими для лазерного воздействия, что позволяет достичь дополнительного контраста для содержащихся в них серебряных объектов.

В качестве образцов использовались гибридные контейнеры размером $3,0 \pm 0,8$ мкм и $0,9 \pm 0,1$ мкм. Последовательность синтеза микроконтейнеров и их разрушение с последовательной десорбцией изображено на рисунке 18. Для начала были синтезированы микрочастицы карбоната кальция и загружены конъюгатом ТРИЦ-БСА— биологически значимым питательным веществом для клеточных и микробных культур, использованным в данной работе в качестве модели для *in vivo* высвобождения. Загрузка конъюгата ТРИЦ-БСА составила $40 \pm 0,14\%$ (вес) для частиц размером $3,0 \pm 0,8$ мкм ($\zeta = 30 \pm 0,8$ мВ) и $39 \pm 0,44\%$ (вес) для частиц размером $0,8$ мкм ($\zeta = -20 \pm 1,6$ мВ) [96].

Константа скорости десорбции конъюгата ТРИЦ-БСА из микроконтейнеров в водном растворе составила $0,0136 \text{ ч}^{-1}$ после 3 часов инкубации. После 24 часов константа скорости десорбции конъюгата составила $0,0093$ (рисунок 20). При сокращении количества серебра, адсорбированного на ядре микроконтейнеров при их получении, скорость константы десорбции конъюгата из микроконтейнеров возрастает, что связано с истончением оболочки.

Расчёт константы десорбции

Для расчета константы десорбции k для каждого из процессов, использовали данные о концентрациях и времени. Для этого сначала определяли начальную концентрацию C_0 для каждого процесса. Для расчета константы десорбции (или

скорости растворения) для трех процессов, использовали уравнение первого порядка реакции, которое связывает изменение концентрации с временем. Упрощенно, это можно выразить как:

$$\ln \frac{C_0}{C_t} = k \times t \quad (6)$$

где C_0 – начальная концентрация,

C_t – концентрация в момент времени t ,

k – константа скорости десорбции,

t – время.

Для каждого из процессов рассчитали константу скорости десорбции, используя данные о концентрациях и времени.

Для каждого процесса можно построить график зависимости $\ln(C_0/C_t)$ от времени и вычислить наклон линии, что даст значение константы скорости десорбции k .

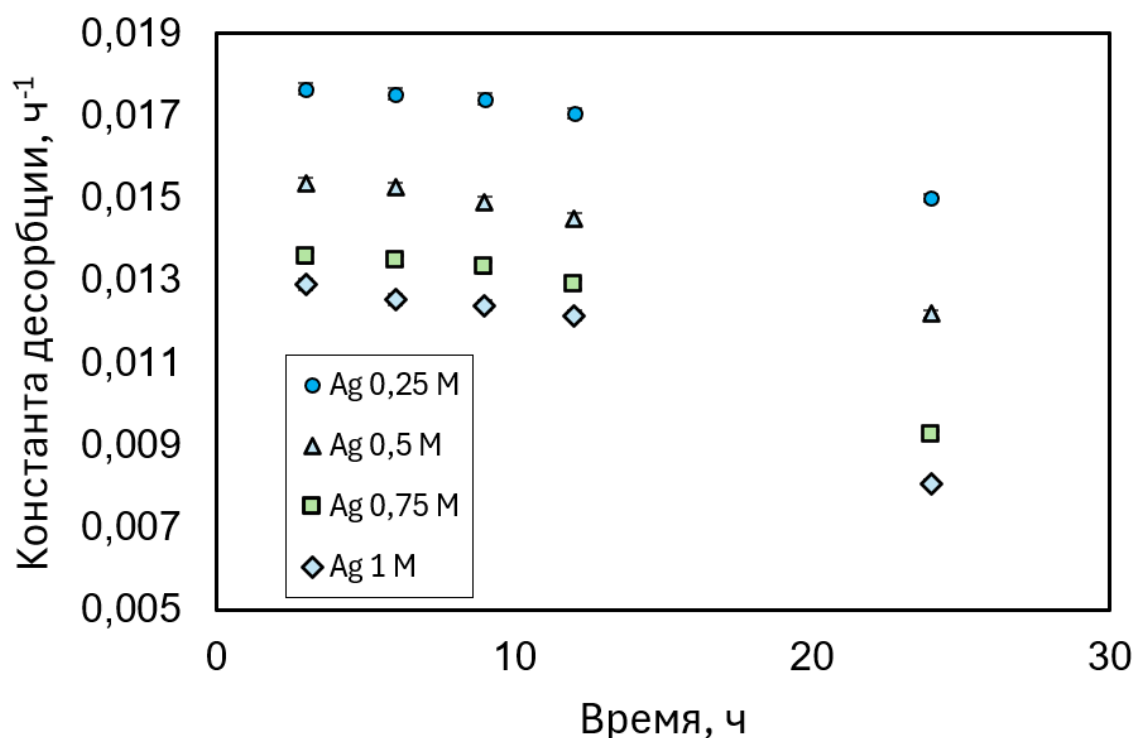


Рисунок 20 – Зависимости константы скорости десорбции конъюгата ТРИЦ-БСА из микроконтейнеров от времени инкубации при различном содержании серебра в оболочках.

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

Скорость высвобождения молекул конъюгата ТРИЦ-БСА была измерена из микроконтейнеров в водном растворе (рисунок 21). По оценкам, количество оставшегося конъюгата ТРИЦ-БСА после 24 часов инкубации составило примерно $20 \pm 0,32\%$. После 3 часов наблюдалось высвобождение около 4% конъюгата [12,157].

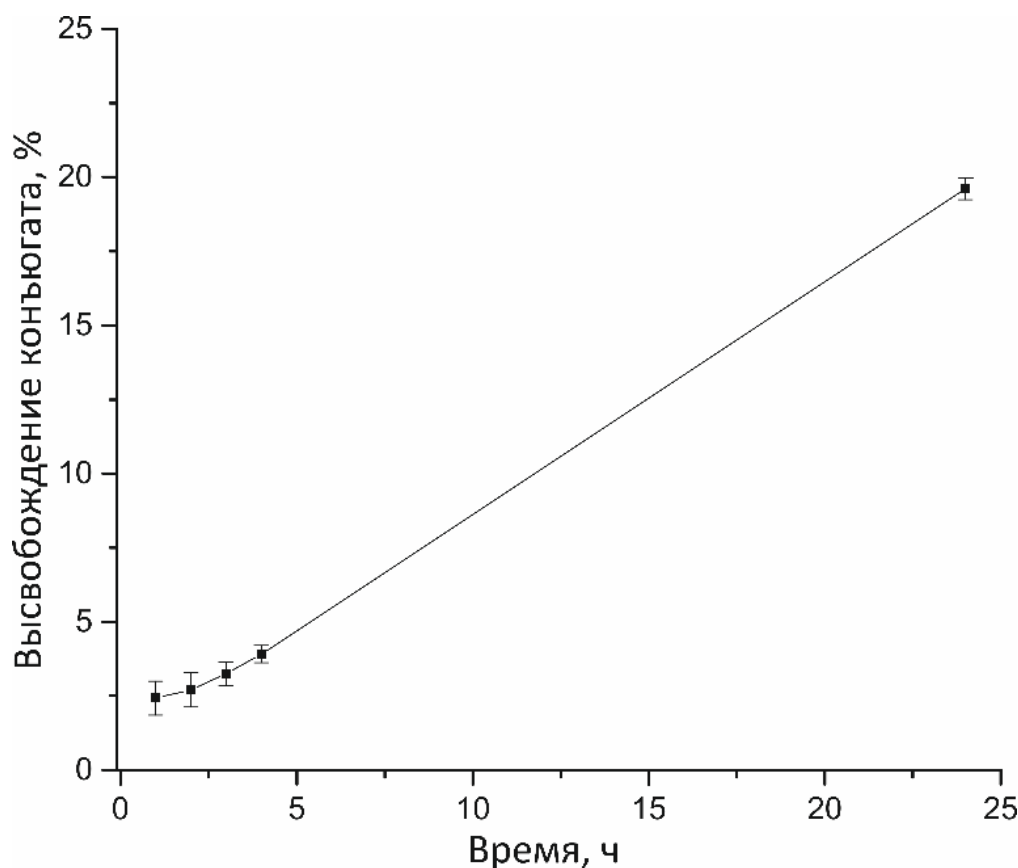


Рисунок 21 – Профиль высвобождения молекул конъюгата ТРИЦ-БСА из контейнеров.

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

В качестве образцов использовались гибридные контейнеры размером $3,0 \pm 0,8$ мкм и $0,9 \pm 0,1$ мкм. Поглощение контейнеров нематодами оценивалось через 4 и 24 часа (рисунок 22). В течение первых 4 часов наблюдалось незначительное накопление микроконтейнеров в организме нематоды. Микроконтейнеры размером $3,0 \pm 0,8$ мкм продемонстрировали низкое накопление в кишечнике: 1-2 микроконтейнера в организме нематоды. В то же время использование микроконтейнеров размером $0,9 \pm 0,1$ мкм привело к выявлению более 10 контейнеров в организме *C. elegans* (рисунок 22 а, в). Через 24 часа наблюдалось увеличение количества контейнеров в организме *C. elegans* как для контейнеров размером $0,9 \pm 0,1$ мкм, так и для контейнеров размером $3,0 \pm 0,8$ мкм (рисунок 22 б, г).

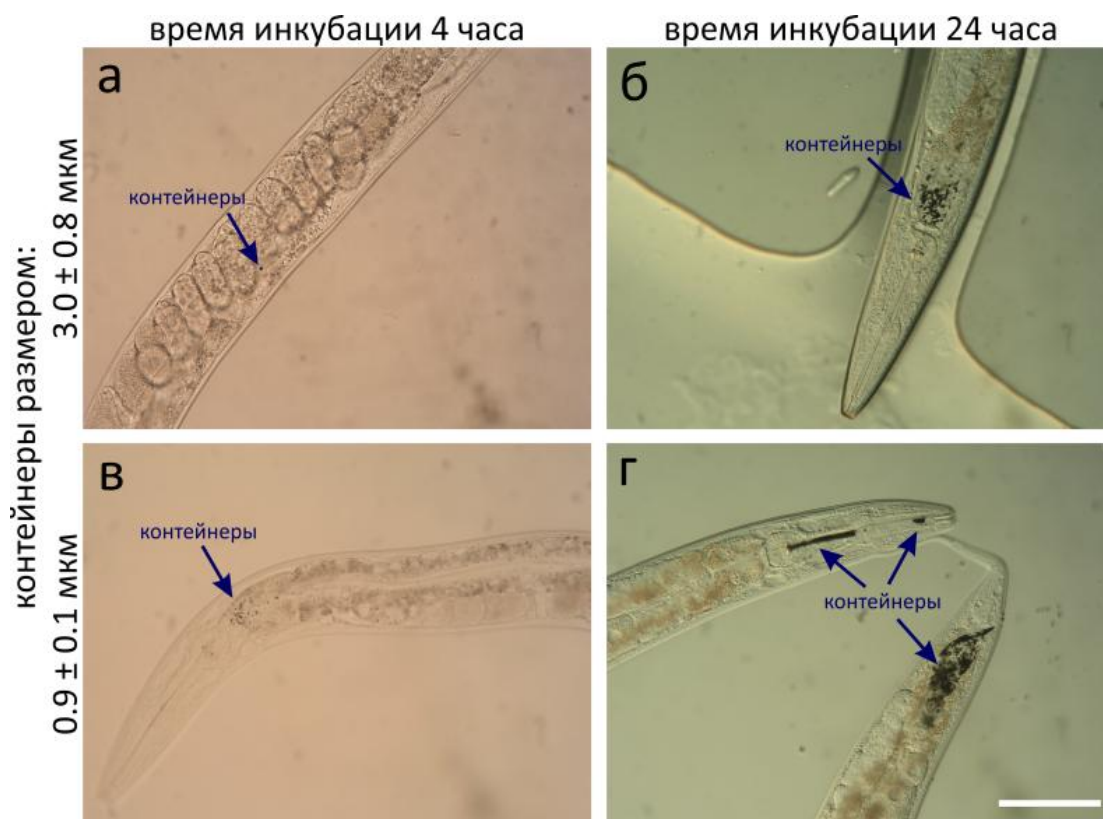


Рисунок 22 – Фазово-контрастные микроскопические изображения *C. elegans* с гибридными контейнерами внутри (размеры контейнеров составляют $3,0 \pm 0,8$ мкм (а, б) и $0,9 \pm 0,1$ мкм (в, г)) при разном времени инкубации: 4 часа (а, в) и 24 часа (б, г). Масштабная линейка составляет 40 мкм.

Хотя микроконтейнеры размером $0,9 \pm 0,1$ представляются оптимальными для кормления *C. elegans*, частицы размером $3,0 \pm 0,8$ мкм обладают преимуществом в визуализации с помощью микроскопии Номарского и флуоресцентной микроскопии, позволяя проводить подробное изучение лазерно-стимулированного высвобождения. Поглощение микроконтейнеров *C. elegans* было подтверждено конфокальной микроскопией через 4 часа (рисунок 23). Накопление частиц внутри кишечника заняло менее 4 часов, что подтверждается трехмерной конфокальной реконструкцией представлено на рисунке 23 а-в.

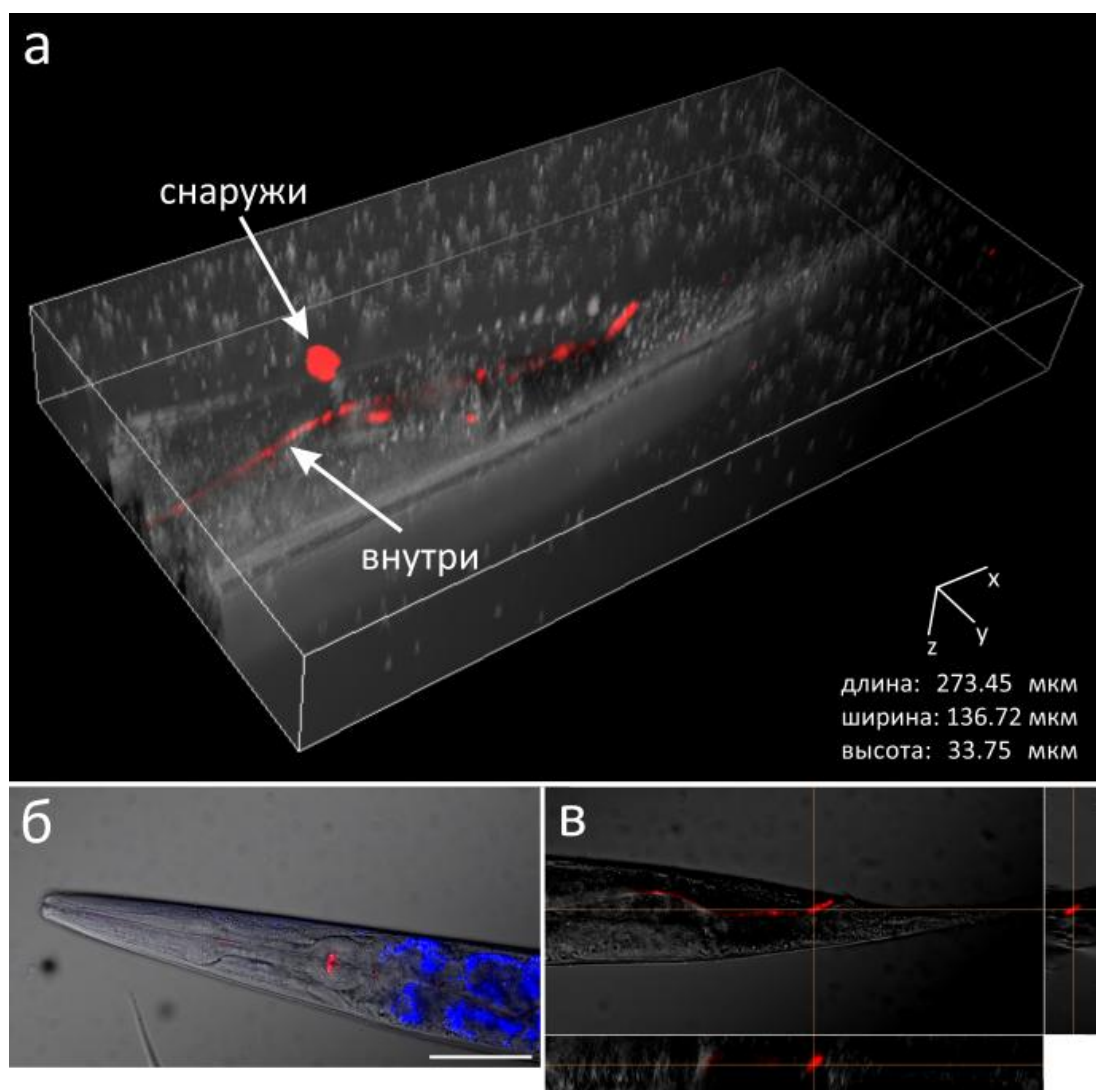


Рисунок 23 – Изображения конфокальной флуоресцентной микроскопии *C. elegans* с гибридными контейнерами (размер $3,0 \pm 0,8$ мкм). 3D-изображение нематода с контейнерами, загруженными молекулами конъюгата ТРИЦ-БСА (красный цвет), изображение показывает контейнеры внутри (в кишечнике червя)

и снаружи (а). 2D изображение *C. elegans* кишечника (синий цвет) и контейнеров (красный цвет) - масштабная линейка соответствует 50 мкм (б). Поперечное сечение прямой кишки нематода с гибридными контейнерами (в).

Для исследования высвобождения конъюгата ТРИЦ-БСА в *C. elegans* были использованы те же интенсивности лазерного излучения, что и при экспериментах на поверхности агар-агара. Был выбран участок нематоды (рисунок 24), содержащий микроконтейнеры и подвергался лазерному излучению в течение 10 секунд с последующей оценкой профилей флуоресценции конъюгата. Воздействие лазера с интенсивностью излучения 5 мВт на микроконтейнеры нагруженные конъюгатом в нематоде не привело к высвобождению инкапсулированных молекул.

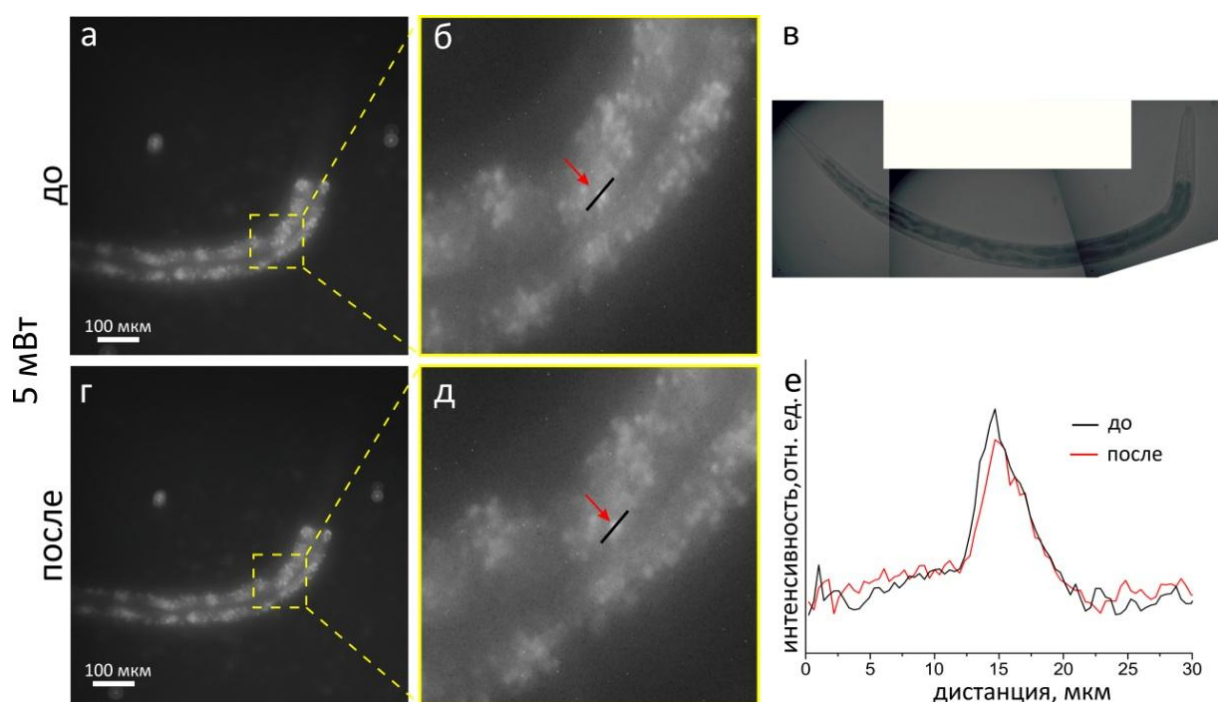


Рисунок 24 – Оптические изображения *C. elegans* и приближенного участка *C. elegans* с внедренными серебряными альгинатными микроконтейнерами, содержащими инкапсулированные молекулы конъюгата ТРИЦ-БСА, до (а, г) и после (б, д) высвобождения, соответствующий профиль вдоль линий, изображенных на (е).

При воздействии лазера с интенсивностью излучения 15 мВт на микроконтейнеры нагруженные конъюгатом ТРИЦ-БСА в нематоде привело к значительному изменению интенсивности флуоресценции, что обусловлено высвобождением конъюгата из микроконтейнеров.

Профили интенсивности вдоль одного и того же микроконтейнера до и после лазерной обработки представлены на рисунке 25. Для обеспечения единообразной флуоресцентной визуализации и сопоставимости результатов были собраны профили интенсивности двух контрольных объектов, не подвергавшихся лазерному облучению: область с гибридными микроконтейнерами вне нематоды («контрольные контейнеры» на правой панели рисунка 25 б, г) и участок нематоды без микроконтейнеров, демонстрирующий только автофлуоресценцию («контрольная АФ» на рисунке 25 б, г). Таким образом, было оценено изменение интенсивности флуоресценции (за счет высвобождения конъюгата ТРИЦ-БСА) в поглощенных микроконтейнерах после лазерного облучения (линии 2 и 3 на рисунке 25 б, г). Из профилей, представленных на правой панели рисунку 25, четко видно, что общая интенсивность значительно уменьшается после 10-секундного лазерного облучения при мощности 15 мВт, в то время как в необработанных (контрольных) областях изменения отсутствуют.

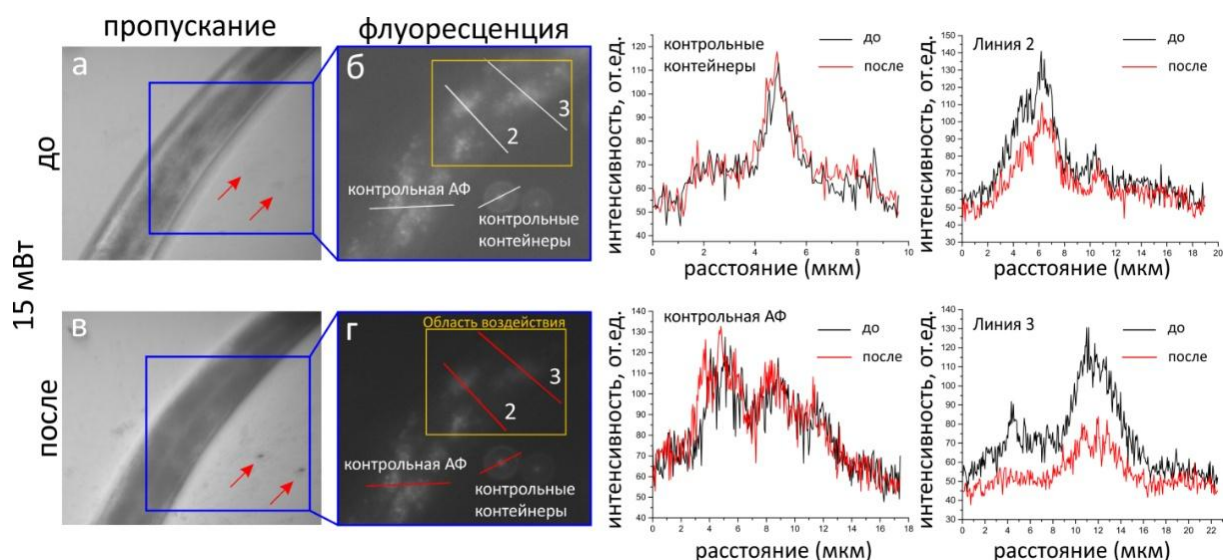


Рисунок 25 –Высвобождение конъюгата ТРИЦ-БСА посредством лазера из контейнеров в нематоде *C. elegans*. Слева: светопольная микроскопия на пропускание и флуоресцентные изображения одной того же участка червя *C.*

elegans с захваченными контейнерами непосредственно перед (верхний ряд, а и б) и после (нижний ряд, в и г) лазерного излучения при 15 мВт. Правая панель демонстрирует соответствующие профили интенсивности вдоль линий, показанных на (в, г), контрольная автофлуоресценция – срез нематоды без контейнеров.

Это позволяет связывать снижение интенсивности флуоресценции конъюгата исключительно с его десорбцией через оболочку микроконтейнера, а не с выцветанием модельного конъюгата ТРИЦ-БСА при воздействии лазера. Это также подтверждается тем фактом, что длина волны лазера 785 нм обладает меньшей энергией и находится далеко от пика возбуждения ТРИЦа (около 600 нм). Вероятно, десорбция модельного конъюгата ТРИЦ-БСА распространяется медленнее внутри нематоды, поэтому интенсивное уширение пика не наблюдалось при облучении поглощенных микроконтейнеров и их непосредственной визуализации после этого.

Десорбция модального конъюгата ТРИЦ-БСА под воздействием лазера может происходить двумя способами: Первый и самый простой – «взрывной» [161,162], когда чрезмерное накопление температуры на оболочке носителя приводит к ее взрыву, сопровождающемуся высвобождением и образованием пузырьков из перегретой жидкости. Другой возможный способ, требующий лучшего контроля над всей оптической системой, — это неразрушающее высвобождение, при котором инкапсулированные вещества выходят из буквально нетронутой оболочки, подобное описано в [163] где такое высвобождение было достигнуто при еще большей оптической мощности 50 мВт, хотя и с использованием несколько иных носителей. В данном исследовании было успешно показано высвобождения как одним, так и другим способом, контролируя разреженность или плотность наночастиц и интенсивность падающего лазерного света.

Из всего вышеизложенного можно сделать вывод, что лазерное излучение (785 нм, 15 мВт, 10 с) вызывает десорбцию конъюгата ТРИЦ-БСА из гибридных микроконтейнеров *in vivo* в *C. elegans* без видимого вреда для организма.

ВЫВОДЫ

1. Разработан способ получения микроконтейнеров методом темплатного синтеза, обеспечивающий одновременное протекание растворения частиц ватерита и формирования активных центров в полимерной матрице. Исследование термодинамических и кинетических аспектов позволило выявить основные физико-химические закономерности формирования структур «ядро-оболочка», что способствует контролю морфологии и функциональных свойств микроконтейнеров.

2. Установлено влияние состава темплатных ядер ватерита на структуру гибридной альгинатной оболочки. Показано, что концентрация нитрата серебра существенно влияет на поверхностную плотность и размер, а также образование структурных дефектов. При низких концентрациях нитрата серебра (0,1 М) наблюдается недостаточная плотность наночастиц в оболочке микроконтейнеров. В то же время высокие концентрации (1,25 М) приводят к образованию игольчатых структур. Оптимальная концентрация нитрата серебра 0,75 М способствует формированию наночастиц серебра размером 35 ± 9 нм с высокой плотностью дефектов двойников в гранецентрированной кубической решетке {111}. Синтез наночастиц серебра, проводимый *in situ* в альгинатной матрице оболочек микроконтейнеров, с небольшими (т.е. расстояние между наночастицами серебра 1–5 нм) межчастичными плазмон-поляритонными переходами в альгинатной матрице оболочек микроконтейнеров позволяет значительно повысить интенсивность сигнала комбинационного рассеяния света, что позволяет детектировать присутствие в суспензии модельного соединения Родамин Б в диапазоне концентраций от 0,01 до 1000 мкМ.

3. Установлено влияние условий сорбции магнитных наночастиц в различные слои микроконтейнеров на эффективность процесса. Показана зависимость между содержанием магнитных наночастиц и размером микроконтейнеров, в том числе при добавлении МНЧ во внешние слои. В частности, увеличение содержания наночастиц магнетита в оболочке приводит к

росту размеров микроконтейнеров: при сорбции наночастиц внутренней поверхностью оболочек размер увеличивается примерно на 77% по сравнению с образцами без магнетита (средний размер увеличился с $3,9 \pm 0,5$ мкм до $6,9 \pm 0,9$ мкм). Количество адсорбированных наночастиц МНЧ прямо пропорционально увеличению размеров контейнеров, что негативно сказывается на седиментационной устойчивости.

4. Определены зависимости констант скорости десорбции конъюгата ТРИЦ-БСА из микроконтейнеров в водном растворе от содержания серебра в оболочке микроконтейнеров. С увеличением содержания серебра в оболочке микроконтейнеров (от 0,25 М до 0,5 М) наблюдается снижение константы скорости десорбции конъюгата ТРИЦ-БСА (с 0,0176 до 0,0129 ч⁻¹ после 3 часов инкубации). Это свидетельствует о том, что более высокая доля серебра в оболочке способствует более устойчивому удержанию конъюгата внутри микроконтейнеров, замедляя процесс его высвобождения. Таким образом, увеличение содержания серебра в оболочке приводит к снижению скорости десорбции, за счет утолщения и изменения свойств оболочки, что препятствует быстрому высвобождению активного вещества.

5. Установлено влияние размера использованных темплатных ядер на результаты ультразвуковой обработки суспензии микроконтейнеров. Показано, что скорость десорбции и степень разрушения контейнеров ультразвуковым воздействием (35 кГц, 0,64 Вт/см²) зависят от размера микроконтейнеров, причем наибольший эффект наблюдается для контейнеров размером 3.0 ± 0.8 мкм, что связывается с неоднородностью их оболочки. Микроконтейнеры меньшего размера (0.9 ± 0.1 мкм) демонстрируют повышенную устойчивость к УЗ-воздействию. Полученные данные указывают на возможность контролируемого высвобождения инкапсулированного вещества с помощью ультразвука.

6. Лазерное излучение (15 мВт, 785 нм) эффективно стимулирует десорбцию конъюгата ТРИЦ-БСА из разрушенных оболочек гибридных микроконтейнеров в нематоде, о чём свидетельствует значительное снижение

флуоресценции. Воздействие меньшей мощности (5 мВт) не приводит к десорбции конъюгата. Контрольные эксперименты исключили фотовыцветание флуорофора как причину снижения сигнала. Продемонстрирована возможность контролируемой десорбции инкапсулированного вещества посредством лазерного облучения.

7. Проведена апробация гибридных микроконтейнеров с адсорбированным модельным конъюгатом ТРИЦ-БСА на биологической модели нематоды *C. elegans*. Установлено, что синтезированные наночастицы серебра *in situ* в альгинатной матрице оболочек микроконтейнеров способны вызывать десорбцию высокомолекулярного соединения из альгинатных микроконтейнеров под воздействием ИК лазерного излучения, включая условия *in vivo*, без негативного влияния на биологические объекты (*C. elegans*).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skirtach, A.G. Encapsulation, release and applications of LbL polyelectrolyte multilayer capsules / A.G. Skirtach, A.M. Yashchenok, H. Möhwald // *Chemical Communications*. — 2011. — № 48 (47). — P. 12736.
2. Wuytens, P. Pharmacological aspects of release from microcapsules - From polymeric multilayers to lipid membranes / P. Wuytens, B. Parakhonskiy, A. Yashchenok, M. Winterhalter, A. Skirtach // *Current Opinion in Pharmacology*. — 2014. — (18). — P. 129–140.
3. Reguera, J. Synthesis of Janus plasmonic–magnetic, star–sphere nanoparticles, and their application in SERS detection / J. Reguera, D. Jiménez de Aberasturi, N. Winckelmans, J. Langer, S. Bals, L.M. Liz-Marzán // *Faraday Discuss.* — 2016. — (191). — P. 47–59.
4. Fales, A.M. Silica-coated gold nanostars for combined surface-enhanced Raman scattering (SERS) detection and singlet-oxygen generation: A potential nanoplatform for theranostics / A.M. Fales, H. Yuan, T. Vo-Dinh // *Langmuir*. — 2011. — № 19 (27). — P. 12186–12190.
5. Abou El-Nour, K.M.M. Synthesis and applications of silver nanoparticles // *Arabian Journal of Chemistry*. — 2010. V. 3. 3. 135–140 P.
6. Parakhonskiy, B. V. Nanoparticles on Polyelectrolytes at Low Concentration: Controlling Concentration and Size / B. V. Parakhonskiy, M.F. Bedard, T. V. Bukreeva, G.B. Sukhorukov, H. Möhwald, A.G. Skirtach // *The Journal of Physical Chemistry C*. — 2010. — № 5 (114). — P. 1996–2002.
7. Abalde-Cela, S. Surface-enhanced Raman scattering biomedical applications of plasmonic colloidal particles. / S. Abalde-Cela, P. Aldeanueva-Potel, C. Mateo-Mateo, L. Rodríguez-Lorenzo, R.A. Alvarez-Puebla, L.M. Liz-Marzán // *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*. — 2010. — (7 Suppl 4). — P. S435–S450.
8. Saha, S. Alginate Gel-Mediated Photochemical Growth of Mono- and Bimetallic Gold and Silver Nanoclusters and Their Application to Surface-Enhanced Raman Scattering / S. Saha, A. Pal, S. Pande, S. Sarkar, S. Panigrahi, T. Pal // *The Journal of*

Physical Chemistry C. — 2009. — № 18 (113). — P. 7553–7560.

9. Prikhozhenko, E.S. Biocompatible Chitosan Nanofibers Functionalized with Silver Nanoparticles for SERS Based Detection / E.S. Prikhozhenko, E.V. Lengert, B.V. Parakhonskiy, D.A. Gorin, G.B. Sukhorukov, A.M. Yashchenok // *Acta Physica Polonica A*. — 2016. — № 2 (129). — P. 247–249.

10. Bédard, M.F. On the mechanical stability of polymeric microcontainers functionalized with nanoparticles / M.F. Bédard, A. Munoz-Javier, R. Mueller, P. del Pino, A. Fery, W.J. Parak, A.G. Skirtach, G.B. Sukhorukov // *Soft Matter*. — 2009. — № 1 (5). — P. 148–155.

11. 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 // *J. Mater. Chem.* — 2007. — № 11 (17). — P. 1050–1054.

12. Lengert, E. Laser-induced remote release in vivo in *C. elegans* from novel silver nanoparticles-alginate hydrogel shells / E. Lengert, B. Parakhonskiy, D. Khalkenow, A. Zečić, M. Vangheel, J.M. Monje Moreno, B.P. Braeckman, A.G. Skirtach // *Nanoscale*. — 2018. — № 36 (10). — P. 17249–17256.

13. Lee, K.Y. Alginate: Properties and biomedical applications / K.Y. Lee, D.J. Mooney // *Progress in Polymer Science (Oxford)*. — 2012. — (37). — P. 106–126.

14. Petrosyan, A. Regenerative medicine technologies applied to transplant medicine. An update / A. Petrosyan, F. Montali, A. Peloso, A. Citro, L.N. Byers, C. La Pointe, M. Suleiman, A. Marchetti, E.P. McNeill, A.L. Speer, W.H. Ng, X. Ren, B. Bussolati, L. Perin, P. Di Nardo, V. Cardinale, J. Duisit, A.R. Monetti, J.R. Savino, A. Asthana, G. Orlando // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. — 2022. — (10).

15. Adamiak, K. State of Innovation in Alginate-Based Materials / K. Adamiak, A. Sionkowska // *Marine Drugs*. — 2023. — № 6 (21). — P. 353.

16. George, M. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review / M. George, T.E. Abraham // *Journal of Controlled Release*. — 2006. — № 1 (114). — P. 1–14.

17. Oltarzhevskaya, N.D. The application of the hidrogel-based medicinal compositions for the targeted delivery of medications in rhino- and otosurgery / N.D. Oltarzhevskaya,

- I.M. Kirichenko, N.A. Khar'kova, S. V. Frolov // *Vestnik otorinolaringologii*. — 2018. — № 5 (83). — P. 68.
18. Abourehab, M.A.S. Alginate as a Promising Biopolymer in Drug Delivery and Wound Healing: A Review of the State-of-the-Art / M.A.S. Abourehab, R.R. Rajendran, A. Singh, S. Pramanik, P. Shrivastav, M.J. Ansari, R. Manne, L.S. Amaral, A. Deepak // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2022. — № 16 (23). — P. 9035.
19. Tomić, S.L. Alginate-Based Hydrogels and Scaffolds for Biomedical Applications / S.L. Tomić, M.M. Babić Radić, J.S. Vuković, V. V. Filipović, J. Nikodinovic-Runic, M. Vukomanović // *Marine Drugs*. — 2023. — № 3 (21). — P. 177.
20. Tan, J. Development of alginate-based hydrogels: Crosslinking strategies and biomedical applications / J. Tan, Y. Luo, Y. Guo, Y. Zhou, X. Liao, D. Li, X. Lai, Y. Liu // *International Journal of Biological Macromolecules*. — 2023. — (239). — P. 124275.
21. Волкова, И.Ф. Гидрогели на основе интерполимерных комплексов альгината натрия и синтетических поликислот / И.Ф. Волкова, Э.С. Григорян, Г.А. Шандрюк, М.Ю. Горшкова // *Высокомолекулярные соединения А*. — 2023. — № 1 (65). — P. 54–64.
22. Bustamante-Torres, M. Hydrogels Classification According to the Physical or Chemical Interactions and as Stimuli-Sensitive Materials / M. Bustamante-Torres, D. Romero-Fierro, B. Arcentales-Vera, K. Palomino, H. Magaña, E. Bucio // *Gels*. — 2021. — № 4 (7). — P. 182.
23. Kędzierska, M. Analysis of the Influence of Both the Average Molecular Weight and the Content of Crosslinking Agent on Physicochemical Properties of PVP-Based Hydrogels Developed as Innovative Dressings / M. Kędzierska, M. Jamroży, A. Drabczyk, S. Kudłacik-Kramarczyk, M. Bańkosz, M. Gruca, P. Potemski, B. Tyliczszak // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2022. — № 19 (23). — P. 11618.
24. Crow, B.B. Release of bovine serum albumin from a hydrogel-cored biodegradable polymer fiber / B.B. Crow, K.D. Nelson // *Biopolymers*. — 2006. — № 6 (81). — P. 419–427.

25. Kuo, C.K. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties / C.K. Kuo, P.X. Ma // *Biomaterials*. — 2001. — № 6 (22). — P. 511–521.
26. Augst, A.D. Alginate Hydrogels as Biomaterials / A.D. Augst, H.J. Kong, D.J. Mooney // *Macromolecular Bioscience*. — 2006. — № 8 (6). — P. 623–633.
27. Drury, J.L. The tensile properties of alginate hydrogels / J.L. Drury, R.G. Dennis, D.J. Mooney // *Biomaterials*. — 2004. — № 16 (25). — P. 3187–3199.
28. Suzuki, Y. Evaluation of a novel alginate gel dressing: Cytotoxicity to fibroblasts in vitro and foreign-body reaction in pig skin in vivo / Y. Suzuki, Y. Nishimura, M. Tanihara, K. Suzuki, T. Nakamura, Y. Shimizu, Y. Yamawaki, Y. Kakimaru // *Journal of Biomedical Materials Research*. — 1998. — № 2 (39). — P. 317–322.
29. Zhao, X. Stress-relaxation behavior in gels with ionic and covalent crosslinks / X. Zhao, N. Huebsch, D.J. Mooney, Z. Suo // *Journal of Applied Physics*. — 2010. — № 6 (107).
30. Ambrosino, M. Microencapsulation of mesenchymal stromal cells in covalent alginate hydrogels for cell therapy // — 2023.
31. Feng, J. High-Performance Sunlight-Induced Polymerized Hydrogels and Applications in 3D and 4D Printing / J. Feng, Z. Liu, T. Gao, D. Gigmes, F. Morlet-Savary, M. Schmitt, C. Dietlin, T. Petithory, L. Pieuchot, J. Zhang, W. Shan, P. Xiao, F. Dumur, J. Lalevée // *Small*. — 2025. — № 5 (21).
32. Golubinskaya, P.A. Application of hydrogel scaffolds as a cell substrate for cartilage tissue regeneration / P.A. Golubinskaya, A.S. Pikina, E.S. Ruchko, T. V. Vladimirova, A.N. Bogomazova, A. V. Ereemeev // *Genes & Cells*. — 2024. — № 1 (19). — P. 43–59.
33. Anggelia, M.R. Thermosensitive Hydrogels as Targeted and Controlled Drug Delivery Systems: Potential Applications in Transplantation / M.R. Anggelia, H. Cheng, C. Lin // *Macromolecular Bioscience*. — 2024.
34. Fan, R. Thermosensitive Hydrogels and Advances in Their Application in Disease Therapy / R. Fan, Y. Cheng, R. Wang, T. Zhang, H. Zhang, J. Li, S. Song, A. Zheng // *Polymers*. — 2022. — № 12 (14). — P. 2379.

35. Ansari, M.J. Poly(N-isopropylacrylamide)-Based Hydrogels for Biomedical Applications: A Review of the State-of-the-Art / M.J. Ansari, R.R. Rajendran, S. Mohanto, U. Agarwal, K. Panda, K. Dhotre, R. Manne, A. Deepak, A. Zafar, M. Yasir, S. Pramanik // *Gels*. — 2022. — № 7 (8). — P. 454.
36. Gialouri, A. Thermoresponsive Alginate-Graft-pNIPAM/Methyl Cellulose 3D-Printed Scaffolds Promote Osteogenesis In Vitro / A. Gialouri, S.F. Saravanou, K. Loukelis, M. Chatzinikolaidou, G. Pasparakis, N. Bouropoulos // *Gels*. — 2023. — № 12 (9). — P. 984.
37. Zhao, S. Synthesis and characterization of thermo-sensitive semi-IPN hydrogels based on poly(ethylene glycol)-co-poly(ϵ -caprolactone) macromer, N-isopropylacrylamide, and sodium alginate / S. Zhao, M. Cao, H. Li, L. Li, W. Xu // *Carbohydrate Research*. — 2010. — № 3 (345). — P. 425–431.
38. Donati, I. Alginate-metal cation interactions: Macromolecular approach / I. Donati, B.E. Christensen // *Carbohydrate Polymers*. — 2023. — (321). — P. 121280.
39. Braccini, I. Molecular Basis of Ca²⁺-Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited / I. Braccini, S. Pérez // *Biomacromolecules*. — 2001. — № 4 (2). — P. 1089–1096.
40. Li, L. Reexamining the Egg-Box Model in Calcium–Alginate Gels with X-ray Diffraction / L. Li, Y. Fang, R. Vreeker, I. Appelqvist, E. Mendes // *Biomacromolecules*. — 2007. — № 2 (8). — P. 464–468.
41. Kühbeck, D. Evaluation of the nitroaldol reaction in the presence of metal ion-crosslinked alginates / D. Kühbeck, J. Mayr, M. Häring, M. Hofmann, F. Quignard, D. Díaz Díaz // *New Journal of Chemistry*. — 2015. — № 3 (39). — P. 2306–2315.
42. Smidsrød, O. Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state / O. Smidsrød // *Faraday Discuss. Chem. Soc.* — 1974. — № 0 (57). — P. 263–274.
43. Ouwerx, C. Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations / C. Ouwerx, N. Velings, M. Mestdagh, M.A. Axelos // *Polymer Gels and Networks*. — 1998. — № 5 (6). — P. 393–408.
44. Malektaj, H. Mechanical Properties of Alginate Hydrogels Cross-Linked with

- Multivalent Cations / H. Malektaj, A.D. Drozdov, J. deClaville Christiansen // *Polymers*. — 2023. — № 14 (15). — P. 3012.
45. Massana Roquero, D. Iron(III)-cross-linked alginate hydrogels: a critical review / D. Massana Roquero, A. Othman, A. Melman, E. Katz // *Materials Advances*. — 2022. — № 4 (3). — P. 1849–1873.
46. Sapkota, T. Fabrication of cell-laden hydrogel microcapsules of alginate and chitin fibrils using divalent and trivalent metal ions / T. Sapkota, S. Shrestha, B.P. Regmi, N. Bhattarai // *RSC Advances*. — 2025. — № 16 (15). — P. 12876–12895.
47. Urbanova, M. Interaction Pathways and Structure–Chemical Transformations of Alginate Gels in Physiological Environments / M. Urbanova, M. Pavelkova, J. Czernek, K. Kubova, J. Vyslouzil, A. Pechova, D. Molinkova, J. Vyslouzil, D. Vetchy, J. Brus // *Biomacromolecules*. — 2019. — № 11 (20). — P. 4158–4170.
48. Qin, Y. Silver-containing alginate fibres and dressings / Y. Qin // *International Wound Journal*. — 2005. — № 2 (2). — P. 172–176.
49. Tu, N.T.T. Silver nanoparticles loaded on lactose/alginate: in situ synthesis, catalytic degradation, and pH-dependent antibacterial activity / N.T.T. Tu, T.L.-A. Vo, T.T.-T. Ho, K.-P.T. Dang, V.-D. Le, P.N. Minh, C.-H. Dang, V.-T. Tran, V.-S. Dang, T.T.K. Chi, H. Vu-Quang, R. Fajgar, T.-L.-H. Nguyen, V.-D. Doan, T.-D. Nguyen // *Beilstein Journal of Nanotechnology*. — 2023. — (14). — P. 781–792.
50. Yang, J. The synthesis of nano-silver/sodium alginate composites and their antibacterial properties / J. Yang, H. Zheng, S. Han, Z. Jiang, X. Chen // *RSC Adv*. — 2015. — (5). — P. 2378–2382.
51. Sharmin, N. Synthesis of Sodium Alginate–Silver Nanocomposites Using Plasma Activated Water and Cold Atmospheric Plasma Treatment / N. Sharmin, C. Pang, I. Sone, J.L. Walsh, C.G. Fernández, M. Sivertsvik, E.N. Fernández // *Nanomaterials*. — 2021. — № 9 (11). — P. 2306.
52. Mohamadinia, P. Preparation And Characterization of Sodium Alginate/Acrylic Acid Composite Hydrogels Conjugated To Silver Nanoparticles As An Antibiotic Delivery System // — 2021.
53. Kürsteiner, R. Time-domain Tollens reaction: synthesising silver nanoparticles with

- the formaldehyde clock / R. Kürsteiner, M. Ritter, A. Sologubenko, L. Stricker, G. Panzarasa // *Nanoscale Advances*. — 2023. — № 8 (5). — P. 2175–2179.
54. Wang, T. Tuning parallel manganese dioxide to hollow parallel hydroxyl oxidize iron replicas for high-performance asymmetric supercapacitors / T. Wang, K. Li, Q. Le, S. Zhu, X. Guo, D. Jiang, Y. Zhang // *Journal of Colloid and Interface Science*. — 2021. — (594). — P. 812–823.
55. Zhang, Z. Synthesis of Silver Nanoparticles and Detection of Glucose via Chemical Reduction with Nanocellulose as Carrier and Stabilizer / Z. Zhang, G. Yang, M. He, L. Qi, X. Li, J. Chen // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2022. — № 23 (23). — P. 15345.
56. Roto, R. Effect of Reducing Agents on Physical and Chemical Properties of Silver Nanoparticles / R. Roto, H.P. Rasydta, A. Suratman, N.H. Aprilita // *Indonesian Journal of Chemistry*. — 2018. — № 4 (18). — P. 614.
57. Tatarchuk, V. V. Kinetic Factors in the Synthesis of Silver Nanoparticles by Reduction of Ag (+) with Hydrazine in Reverse Micelles of Triton N-42 / V. V. Tatarchuk, A.P. Sergievskaya, T.M. Korda, I.A. Druzhinina, V.I. Zaikovsky // *Chemistry of Materials*. — 2013. — № 18 (25). — P. 3570–3579.
58. Demchenko, V. Effect of the type of reducing agents of silver ions in interpolyelectrolyte-metal complexes on the structure, morphology and properties of silver-containing nanocomposites / V. Demchenko, S. Riabov, S. Kobylinskyi, L. Goncharenko, N. Rybalchenko, A. Kruk, O. Moskalenko, M. Shut // *Scientific Reports*. — 2020. — № 1 (10). — P. 7126.
59. Nam, S. Water-based binary polyol process for the controllable synthesis of silver nanoparticles inhibiting human and foodborne pathogenic bacteria / S. Nam, B. Park, B.D. Condon // *RSC Advances*. — 2018. — № 39 (8). — P. 21937–21947.
60. Wolf, J.B. Towards automation of the polyol process for the synthesis of silver nanoparticles / J.B. Wolf, T.M. Stawski, G.J. Smales, A.F. Thünemann, F. Emmerling // *Scientific Reports*. — 2022. — № 1 (12). — P. 5769.
61. Zeroual, S. Ethylene glycol based silver nanoparticles synthesized by polyol process: Characterization and thermophysical profile / S. Zeroual, P. Estellé, D.

- Cabaleiro, B. Vigolo, M. Emo, W. Halim, S. Ouaskit // *Journal of Molecular Liquids*. — 2020. — (310). — P. 113229.
62. Urodkova, E.K. Oligochitosan stabilized silver nanodispersions as a promising basis for SERS substrates / E.K. Urodkova, O.Y. Uryupina, A.A. Averin, E.S. Zhavoronok, I.N. Senchikhin // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. — 2025. — (717). — P. 136786.
63. Chicea, D. Silver Nanoparticles-Chitosan Nanocomposites: A Comparative Study Regarding Different Chemical Syntheses Procedures and Their Antibacterial Effect / D. Chicea, A. Nicolae-Maranciuc, L.-M. Chicea // *Materials*. — 2024. — № 5 (17). — P. 1113.
64. Wongpreecha, J. One-pot, large-scale green synthesis of silver nanoparticles-chitosan with enhanced antibacterial activity and low cytotoxicity / J. Wongpreecha, D. Polpanich, T. Suteewong, C. Kaewsaneha, P. Tangboriboonrat // *Carbohydrate Polymers*. — 2018. — (199). — P. 641–648.
65. Zhou, F.-Z. Sodium-Alginate-Functionalized Silver Nanoparticles for Colorimetric Detection of Dimethoate / F.-Z. Zhou, Y.-H. Chang, C.-C. Hu, T.-C. Chiu // *Biosensors*. — 2022. — № 12 (12). — P. 1086.
66. Liu, H. Alginate-Stabilized Gold Nanoparticles Prepared Using the Microwave-Induced Plasma-in-Liquid Process with Long-Term Storage Stability for Potential Biomedical Applications / H. Liu, K. Ikeda, M.T. Nguyen, S. Sato, N. Matsuda, H. Tsukamoto, T. Tokunaga, T. Yonezawa // *ACS Omega*. — 2022. — № 7 (7). — P. 6238–6247.
67. Kim, M. Il *In Situ* Biosynthesis of a Metal Nanoparticle Encapsulated in Alginate Gel for Imageable Drug-Delivery System / M. Il Kim, C.Y. Park, J.M. Seo, K.S. Kang, K.S. Park, J. Kang, K.S. Hong, Y. Choi, S.Y. Lee, J.P. Park, H.G. Park, T.J. Park // *ACS Applied Materials & Interfaces*. — 2021. — № 31 (13). — P. 36697–36708.
68. Astolfo, A. A simple way to track single gold-loaded alginate microcapsules using x-ray CT in small animal longitudinal studies / A. Astolfo, F. Qie, A. Kibleur, X. Hao, R.H. Menk, F. Arfelli, L. Rigon, T.M. Hinton, M. Wickramaratna, T. Tan, T.C. Hughes // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. — 2014. — № 8 (10). — P.

1821–1828.

69. Upadhyay, U. Development of an alginate–chitosan biopolymer composite with dECM bioink additive for organ-on-a-chip articular cartilage / U. Upadhyay, S. Kolla, S. Maredupaka, S. Priya, K. Srinivasulu, L.K. Chelluri // *Scientific Reports*. — 2024. — № 1 (14). — P. 11765.
70. Ghaffarian, R. Chitosan–Alginate Microcapsules Provide Gastric Protection and Intestinal Release of ICAM-1-Targeting Nanocarriers, Enabling GI Targeting In Vivo / R. Ghaffarian, E. Pérez-Herrero, H. Oh, S.R. Raghavan, S. Muro // *Advanced Functional Materials*. — 2016. — № 20 (26). — P. 3382–3393.
71. Surface Enhanced Raman Spectroscopy S. Schlücker, Wiley, — 2010.
72. Perumal, J. Design and fabrication of random silver films as substrate for SERS based nano-stress sensing of proteins / J. Perumal, K.V. Kong, U.S. Dinish, R.M. Bakker, M. Olivo // *RSC Advances*. — 2014. — № 25 (4). — P. 12995.
73. Khlebtsov, B.N. Gold Nanoisland Films as Reproducible SERS Substrates for Highly Sensitive Detection of Fungicides / B.N. Khlebtsov, V.A. Khanadeev, E. V. Panfilova, D.N. Bratashov, N.G. Khlebtsov // *ACS Applied Materials & Interfaces*. — 2015. — № 12 (7). — P. 6518–6529.
74. Zong, C. In situ synthesis of low-cost and large-scale flexible metal nanoparticle–polymer composite films as highly sensitive SERS substrates for surface trace analysis / C. Zong, M. Ge, H. Pan, J. Wang, X. Nie, Q. Zhang, W. Zhao, X. Liu, Y. Yu // *RSC Advances*. — 2019. — № 5 (9). — P. 2857–2864.
75. Wang, P. In situ polydopamine-assisted deposition of silver nanoparticles on a two dimensional support as an inexpensive and highly efficient SERS substrate / P. Wang, Y. Zhou, Y. Wen, F. Wang, H. Yang // *RSC Advances*. — 2015. — № 46 (5). — P. 36368–36373.
76. Aldeanueva-Potel, P. Recyclable Molecular Trapping and SERS Detection in Silver-Loaded Agarose Gels with Dynamic Hot Spots / P. Aldeanueva-Potel, E. Faoucher, R.A. Alvarez-Puebla, L.M. Liz-Marzán, M. Brust // *Analytical Chemistry*. — 2009. — № 22 (81). — P. 9233–9238.
77. Zhao, Q. Hollow chitosan-alginate multilayer microcapsules as drug delivery

- vehicle: doxorubicin loading and in vitro and in vivo studies. / Q. Zhao, B. Han, Z. Wang, C. Gao, C. Peng, J.C. Shen // *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. — 2007. — № 1 (3). — P. 63–74.
78. Yashchenok, A. Polyelectrolyte multilayer microcapsules templated on spherical, elliptical and square calcium carbonate particles / A. Yashchenok, B. Parakhonskiy, S. Donatan, D. Kohler, A. Skirtach, H. Möhwald // *Journal of Materials Chemistry B*. — 2013. — № 9 (1). — P. 1223.
79. Shenoy, D.B. Microgel-Based Engineered Nanostructures and Their Applicability with Template-Directed Layer-by-Layer Polyelectrolyte Assembly in Protein Encapsulation / D.B. Shenoy, G.B. Sukhorukov // *Macromolecular Bioscience*. — 2005. — № 5 (5). — P. 451–458.
80. Yan, X. Templating assembly of multifunctional hybrid colloidal spheres / X. Yan, J. Li, H. Möhwald // *Advanced Materials*. — 2012. — № 20 (24). — P. 2663–2667.
81. Yashchenok, A.M. Nanoplasmonic smooth silica versus porous calcium carbonate bead biosensors for detection of biomarkers / A.M. Yashchenok, D. Borisova, B.V. Parakhonskiy, A. Masic, B. Pinchasik, H. Möhwald, A.G. Skirtach // *Annalen der Physik*. — 2012. — № 11 (524). — P. 723–732.
82. Sukhorukov, G.B. Porous calcium carbonate microparticles as templates for encapsulation of bioactive compounds / G.B. Sukhorukov, D. V. Volodkin, A.M. Günther, A.I. Petrov, D.B. Shenoy, H. Möhwald // *J. Mater. Chem.* — 2004. — № 14 (14). — P. 2073–2081.
83. She, Z. Mechanism of Protein Release from Polyelectrolyte Multilayer Microcapsules / Z. She, M.N. Antipina, J. Li, G.B. Sukhorukov // *Biomacromolecules*. — 2010. — № 5 (11). — P. 1241–1247.
84. Schmidt, S. Microparticulate biomolecules by mild CaCO₃ templating / S. Schmidt, D. Volodkin // *J. Mater. Chem. B*. — 2013. — № 9 (1). — P. 1210–1218.
85. Parakhonskiy, B. V. Tailored intracellular delivery via a crystal phase transition in 400 nm vaterite particles / B. V. Parakhonskiy, C. Foss, E. Carletti, M. Fedel, A. Haase, A. Motta, C. Migliaresi, R. Antolini // *Biomaterials Science*. — 2013. — № 12 (1). — P. 1273.

86. Svenskaya, Y. Anticancer drug delivery system based on calcium carbonate particles loaded with a photosensitizer / Y. Svenskaya, B. V. Parakhonskiy, A. Haase, V. Atkin, E. Lukyanets, D.A. Gorin, R. Antolini // *Biophysical Chemistry*. — 2013. — (182). — P. 11–15.
87. Volodkin, D. V. Matrix Polyelectrolyte Microcapsules: New System for Macromolecule Encapsulation / D. V. Volodkin, A.I. Petrov, M. Prevot, G.B. Sukhorukov // *Langmuir*. — 2004. — № 8 (20). — P. 3398–3406.
88. Volodkin, D. IR-light triggered drug delivery from micron-sized polymer biocoatings / D. Volodkin, A. Skirtach, N. Madaboosi, J. Blacklock, R. von Klitzing, A. Lankenau, C. Duschl, H. Möhwald // *Journal of Controlled Release*. — 2010. — № 1 (148). — P. e70–e71.
89. Sato, K. Release of Insulin from Calcium Carbonate Microspheres with and without Layer-by-Layer Thin Coatings / K. Sato, M. Seno, J.-I. Anzai // *Polymers*. — 2014. — № 8 (6). — P. 2157–2165.
90. Balabushevich, N.G. Protein-Containing Multilayer Capsules by Templating on Mesoporous CaCO₃ Particles: POST- and PRE-Loading Approaches / N.G. Balabushevich, A. V. Lopez de Guereñu, N.A. Feoktistova, A.G. Skirtach, D. Volodkin // *Macromolecular Bioscience*. — 2016. — № 1 (16). — P. 95–105.
91. Stein, E.W. Real-Time Assessment of Spatial and Temporal Coupled Catalysis within Polyelectrolyte Microcapsules Containing Coimmobilized Glucose Oxidase and Peroxidase / E.W. Stein, D. V. Volodkin, M.J. McShane, G.B. Sukhorukov // *Biomacromolecules*. — 2006. — № 3 (7). — P. 710–719.
92. 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 ed. in English)*. — 2010. — № 44 (49). — P. 8116–8120.
93. Souza, E.F. Vaterite submicron particles designed for photodynamic therapy in cells / E.F. Souza, J.A.R. Ambrósio, B.C.S. Pinto, M. Beltrame, K.K. Sakane, J.G. Pinto, J. Ferreira-Strixino, E.P. Gonçalves, A.R. Simioni // *Photodiagnosis and Photodynamic*

Therapy. — 2020. — (31). — P. 101913.

94. Yefimova, S.L. Synthesis and characterization of mesoporous $\text{CaCO}_3@\text{PSS}$ microspheres as a depot system for sustained Methylene Blue delivering / S.L.

Yefimova, I.I. Bespalova, G.V. Grygorova, A.V. Sorokin, P.V. Mateychenko, X.Q. Cui, Y. V. Malyukin // *Microporous and Mesoporous Materials*. — 2016. — (236). — P. 120–128.

95. Parakhonskiy, B. V. Size controlled hydroxyapatite and calcium carbonate particles: synthesis and their application as templates for SERS platform. / B. V. Parakhonskiy, Y.I. Svenskaya, A.M. Yashchenok, H.A. Fattah, O.A. Inozemtseva, F. Tassarolo, R. Antolini, D.A. Gorin // *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*. — 2014. — (118). — P. 243–8.

96. Parakhonskiy, B. V. Macromolecule Loading into Spherical, Elliptical, Star-Like and Cubic Calcium Carbonate Carriers / B. V. Parakhonskiy, A.M. Yashchenok, S. Donatan, D. V. Volodkin, F. Tassarolo, R. Antolini, H. Möhwald, A.G. Skirtach // *ChemPhysChem*. — 2014. — № 13 (15). — P. 2817–2822.

97. Singh, A. Characterization and Exploration of Placket–Burman-Designed Porous Calcium Carbonate (Vaterite) Microparticles / A. Singh, S.S. Das, P.R.P. Verma, J. Ruokolainen, K.K. Kesari, S.K. Singh // *ACS Omega*. — 2023. — № 47 (8). — P. 44611–44623.

98. Sergeeva, A. Composite Magnetite and Protein Containing CaCO_3 Crystals. External Manipulation and Vaterite Calcite Recrystallization-Mediated Release Performance / A. Sergeeva, R. Sergeev, E. Lengert, A. Zakharevich, B. Parakhonskiy, D. Gorin, S. Sergeev, D. Volodkin // *ACS Applied Materials and Interfaces*. — 2015. — № 38 (7). — P. 21315–21325.

99. Mercato, L.L. del LbL multilayer capsules: recent progress and future outlook for their use in life sciences / L.L. del Mercato, P. Rivera Gil, A.Z. Abbasi, M. Ochs, C. Ganas, I. Zins, C. Sönnichsen, W.J. Parak // *Nanoscale*. — 2010. — № 4 (2). — P. 458–467.

100. Itoh, Y. Enzyme-responsive release of encapsulated proteins from biodegradable hollow capsules / Y. Itoh, M. Matsusaki, T. Kida, M. Akashi // *Biomacromolecules*. —

2006. — № 10 (7). — P. 2715–2718.

101. Sukhorukov, G.B. pH-controlled macromolecule encapsulation in and release from polyelectrolyte multilayer nanocapsules / G.B. Sukhorukov, A.A. Antipov, A. Voigt, E. Donath, H. Möhwald // *Macromolecular Rapid Communications*. — 2001. — № 1 (22). — P. 44–46.

102. Rosenbauer, E.M. Controlled release from polyurethane nanocapsules via pH-, UV-light- or temperature-induced stimuli / E.M. Rosenbauer, M. Wagner, A. Musyanovych, K. Landfester // *Macromolecules*. — 2010. — № 11 (43). — P. 5083–5093.

103. Kozlovskaya, V. Poly(methacrylic acid) hydrogel films and capsules: Response to pH and ionic strength, and encapsulation of macromolecules / V. Kozlovskaya, E. Kharlampieva, M.L. Mansfield, S.A. Sukhishvili // *Chemistry of Materials*. — 2006. — № 2 (18). — P. 328–336.

104. Elsner, N. pH-Triggered softening of crosslinked hydrogen-bonded capsules / N. Elsner, V. Kozlovskaya, S.A. Sukhishvili, A. Fery // *Soft Matter*. — 2006. — № 11 (2). — P. 966–972.

105. Parakhonskiy, B. V. Sub-micrometer vaterite containers: Synthesis, substance loading, and release / B. V. Parakhonskiy, A. Haase, R. Antolini // *Angewandte Chemie - International Edition*. — 2012. — № 5 (51). — P. 1195–1197.

106. Shchukin, D.G. Ultrasonically induced opening of polyelectrolyte microcontainers / D.G. Shchukin, D.A. Gorin, H. Möhwald // *Langmuir*. — 2006. — № 17 (22). — P. 7400–7404.

107. 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. — № 7 (20). — P. 1189–1195.

108. Anandhakumar, S. Silver nanoparticles modified nanocapsules for ultrasonically activated drug delivery / S. Anandhakumar, V. Mahalakshmi, A.M. Raichur // *Materials Science and Engineering C*. — 2012. — № 8 (32). — P. 2349–2355.

109. Long, Y. Bio-inspired controlled release through compression-relaxation cycles of

- microcapsules / Y. Long, C. Liu, B. Zhao, K. Song, G. Yang, C.-H. Tung // *NPG Asia Mater.* — 2015. — (7). — P. e148-.
110. Korolovych, V.F. Impact of high-frequency ultrasound on nanocomposite microcapsules: in silico and in situ visualization / V.F. Korolovych, O.A. Grishina, O.A. Inozemtseva, A. V. Selifonov, D.N. Bratashov, S.G. Suchkov, L.A. Bulavin, O.E. Glukhova, G.B. Sukhorukov, D.A. Gorin // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2016. — № 4 (18). — P. 2389–2397.
111. Lin, H.Y. Factors affecting responsivity of unilamellar liposomes to 20 kHz ultrasound / H.Y. Lin, J.L. Thomas // *Langmuir.* — 2004. — № 15 (20). — P. 6100–6106.
112. Pavlov, A.M. Controlled protein release from microcapsules with composite shells using high frequency ultrasound—potential for in vivo medical use / A.M. Pavlov, V. Saez, A. Cobley, J. Graves, G.B. Sukhorukov, T.J. Mason // *Soft Matter.* — 2011. — № 9 (7). — P. 4341.
113. Albanese, A. [Review] The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems / A. Albanese, P.S. Tang, W.C.W. Chan // *Annual Review of Biomedical Engineering.* — 2012. — № 1 (14). — P. 1–16.
114. Parakhonskiy, B. The influence of the size and aspect ratio of anisotropic, porous CaCO₃ particles on their uptake by cells. / B. Parakhonskiy, M. V Zyuzin, A. Yashchenok, S. Carregal-Romero, J. Rejman, H. Möhwald, W.J. Parak, A.G. Skirtach // *Journal of Nanobiotechnology.* — 2015. — № 1 (13). — P. 53.
115. Chen, J. Theranostic Multilayer Capsules for Ultrasound Imaging and Guided Drug Delivery / J. Chen, S. Ratnayaka, A. Alford, V. Kozlovskaya, F. Liu, B. Xue, K. Hoyt, E. Kharlampieva // *ACS Nano.* — 2017. — № 3 (11). — P. 3135–3146.
116. Xiong, R. Towards theranostic multicompartment microcapsules: In-situ diagnostics and laser-induced treatment / R. Xiong, S.J. Soenen, K. Braeckmans, A.G. Skirtach // *Theranostics.* — 2013. — № 3 (3). — P. 141–151.
117. Skirtach, A.G. The role of metal nanoparticles in remote release of encapsulated materials / A.G. Skirtach, C. Dejumat, D. Braun, A.S. Susa, A.L. Rogach, W.J. Parak, H. Möhwald, G.B. Sukhorukov // *Nano Letters.* — 2005. — № 7 (5). — P. 1371–

1377.

118. Pankhurst, Q.A. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine / Q.A. Pankhurst, J. Connolly, S.K. Jones, J. Dobson // *Journal of Physics D: Applied Physics*. — 2003. — № 13 (36). — P. R167–R181.
119. Golovin, Y.I. Towards nanomedicines of the future: Remote magneto-mechanical actuation of nanomedicines by alternating magnetic fields / Y.I. Golovin, S.L. Gribanovsky, D.Y. Golovin, N.L. Klyachko, A.G. Majouga, A.M. Master, M. Sokolsky, A. V. Kabanov // *Journal of Controlled Release*. — 2015. — (219). — P. 43–60.
120. 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. — № 9 (6). — P. 1879.
121. Rwei, A.Y. Photoresponsive nanoparticles for drug delivery / A.Y. Rwei, W. Wang, D.S. Kohane // *Nano Today*. — 2015. — № 4 (10). — P. 451–467.
122. Galaev, I.Y. Thermoreactive water-soluble polymers, nonionic surfactants, and hydrogels as reagents in biotechnology / I.Y. Galaev, B. Mattiasson // *Enzyme and Microbial Technology*. — 1993. — № 5 (15). — P. 354–366.
123. Marturano, V. Light-Responsive Polymer Micro- and Nano-Capsules / V. Marturano, P. Cerruti, M. Giamberini, B. Tylkowski, V. Ambrogi // *Polymers*. — 2016. — № 1 (9). — P. 8.
124. 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. — № 17 (20). — P. 6988–6992.
125. Hale, G.M. Optical Constants of Water in the 200-nm to 200-μm Wavelength Region / G.M. Hale, M.R. Querry // *Applied Optics*. — 1973. — № 3 (12). — P. 555.
126. Li, X. Ultrafast Near-Infrared Light-Triggered Intracellular Uncaging to Probe Cell Signaling / X. Li, Z. Che, K. Mazhar, T.J. Price, Z. Qin // *Advanced Functional Materials*. — 2017. — № 11 (27). — P. 1605778.
127. Minullina, R.T. Interfacing multicellular organisms with polyelectrolyte shells and nanoparticles: A *caenorhabditis elegans* study / R.T. Minullina, Y.N. Osin, D.G. Ishmuchametova, R.F. Fakhrullin // *Langmuir*. — 2011. — № 12 (27). — P. 7708–

7713.

128. Meyer, J.N. Intracellular uptake and associated toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans* / J.N. Meyer, C.A. Lord, X.Y. Yang, E.A. Turner, A.R. Badireddy, S.M. Marinakos, A. Chilkoti, M.R. Wiesner, M. Auffan // *Aquatic Toxicology*. — 2010. — № 2 (100). — P. 140–150.

129. Dāwlātšina, G.I. Microworms swallow the nanobait: the use of nanocoated microbial cells for the direct delivery of nanoparticles into *Caenorhabditis elegans* / G.I. Dāwlātšina, R.T. Minullina, R.F. Fakhrullin // *Nanoscale*. — 2013. — № 23 (5). — P. 11761.

130. Gonzalez-Moragas, L. *C. elegans* as a tool for in vivo nanoparticle assessment / L. Gonzalez-Moragas, A. Roig, A. Laromaine // *Advances in Colloid and Interface Science*. — 2015. — № February (219). — P. 10–26.

131. Huang, H. Remote control of ion channels and neurons through magnetic-field heating of nanoparticles / H. Huang, S. Delikanli, H. Zeng, D.M. Ferkey, A. Pralle // *Nature Nanotechnology*. — 2010. — № 8 (5). — P. 602–606.

132. Kim, J.H. *C. elegans*-on-a-chip for in situ and in vivo Ag nanoparticles' uptake and toxicity assay / J.H. Kim, S.H. Lee, Y.J. Cha, S.J. Hong, S.K. Chung, T.H. Park, S.S. Choi // *Scientific Reports*. — 2017. — № December 2016 (7). — P. 40225.

133. Kim, S.W. Interaction of Silver Nanoparticles with Biological Surfaces of *Caenorhabditis elegans* / S.W. Kim, S.H. Nam, Y.J. An // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. — 2012. — (77). — P. 64–70.

134. Charan, S. Development of lipid targeting Raman probes for in vivo imaging of *Caenorhabditis elegans* / S. Charan, F.C. Chien, N. Singh, C.W. Kuo, P. Chen // *Chemistry - A European Journal*. — 2011. — № 18 (17). — P. 5165–5170.

135. Fang-Yen, C. Two size-selective mechanisms specifically trap bacteria-sized food particles in *Caenorhabditis elegans*. / C. Fang-Yen, L. Avery, A.D.T. Samuel // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2009. — № 47 (106). — P. 20093–20096.

136. Zhu, Q. Hierarchical twinning governed by defective twin boundary in metallic materials / Q. Zhu, Q. Huang, Y. Tian, S. Zhao, Y. Chen, G. Cao, K. Song, Y. Zhou, W.

- Yang, Z. Zhang, X. An, H. Zhou, J. Wang // *Science Advances*. — 2022. — № 20 (8).
137. Yin, B. Compositionally Induced Twin Defects Control the Shape of Ternary Silver Halide Nanocrystals / B. Yin, X. Huang, R. Mishra, B. Sadtler // *Chemistry of Materials*. — 2017. — № 3 (29). — P. 1014–1021.
138. Hofmeister, H. Configuration of twins in glass-embedded silver nanoparticles of various origin / H. Hofmeister, M. Dubiel, G.L. Tan, K. -D. Schicke // *physica status solidi (a)*. — 2005. — № 12 (202). — P. 2321–2329.
139. Grzelczak, M. Silver Ions Direct Twin-Plane Formation during the Overgrowth of Single-Crystal Gold Nanoparticles / M. Grzelczak, A. Sánchez-Iglesias, H. Heidari, S. Bals, I. Pastoriza-Santos, J. Pérez-Juste, L.M. Liz-Marzán // *ACS Omega*. — 2016. — № 2 (1). — P. 177–181.
140. Svenskaya, Y.I. Ultrasonically assisted fabrication of vaterite submicron-sized carriers / Y.I. Svenskaya, H. Fattah, A.M. Zakharevich, D.A. Gorin, G.B. Sukhorukov, B. V. Parakhonskiy // *Advanced Powder Technology*. — 2016. — № 2 (27). — P. 618–624.
141. German, S. V. In vitro and in vivo MRI visualization of nanocomposite biodegradable microcapsules with tunable contrast / S. V. German, D.N. Bratashov, N.A. Navolokin, A.A. Kozlova, M. V. Lomova, M. V. Novoselova, E.A. Burilova, V. V. Zyev, B.N. Khlebtsov, A.B. Bucharskaya, G.S. Terentyuk, R.R. Amirov, G.N. Maslyakova, G.B. Sukhorukov, D.A. Gorin // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2016. — № 47 (18). — P. 32238–32246.
142. Salter, C. Error Analysis Using the Variance-Covariance Matrix / C. Salter // *Journal of Chemical Education*. — 2000. — № 9 (77). — P. 1239.
143. Lengert, E. Hollow silver alginate microspheres for drug delivery and surface enhanced Raman scattering detection / E. Lengert, A.M. Yashchenok, V. Atkin, A. Lapanje, D.A. Gorin, G.B. Sukhorukov, B. V. Parakhonskiy // *RSC Adv.* — 2016. — № 24 (6). — P. 20447–20452.
144. Volodkin, D. V. Pure protein microspheres by calcium carbonate templating / D. V. Volodkin, R. Von Klitzing, H. Möhwald // *Angewandte Chemie - International Edition*. — 2010. — № 48 (49). — P. 9258–9261.

145. Badnore, A.U. Synthesis of nanosized calcium carbonate using reverse miniemulsion technique: Comparison between sonochemical and conventional method / A.U. Badnore, A.B. Pandit // *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. — 2015. — (98). — P. 13–21.
146. Yusof, N.S.M. A correlation between cavitation bubble temperature, sonoluminescence and interfacial chemistry – A minireview // *Ultrasonics Sonochemistry*. — 2022. V. 85.
147. Bucur, M.-P. Cavitation-Effect-Based Treatments and Extractions for Superior Fruit and Milk Valorisation / M.-P. Bucur, M.-C. Radulescu, G.L. Radu, B. Bucur // *Molecules*. — 2023. — № 12 (28). — P. 4677.
148. Margulis, M.A. Theory of local electrification of cavitation bubbles: new approaches / M.A. Margulis, I.M. Margulis // *Ultrasonics Sonochemistry*. — 1999. — № 1–2 (6). — P. 15–20.
149. Ryu, M. Synthesis of calcium carbonate in ethanol-ethylene glycol solvent / M. Ryu, J. Ahn, K. You, S. Goto, H. Kim // *Journal of the Ceramic Society of Japan*. — 2009. — (1171). — P. 106–110.
150. Lin, Y.H. Ethylene Glycol-Manipulated Syntheses of Calcium Carbonate Particles and DNA Capsules toward Efficient ATP-Responsive Cargo Release / Y.H. Lin, M.M.R. Singuru, D.S.S. Marpaung, W.C. Liao, M.C. Chuang // *ACS Applied Bio Materials*. — 2023. — № 8 (6).
151. Jiang, J. The synthesis of long-term stable amorphous calcium carbonate in water-free ethylene glycol system without any phase stabilizer / J. Jiang, S. Xu, H. Xiao, C. Tao, C. Chen, Q. Li, R. Shi // *Advanced Powder Technology*. — 2022. — № 6 (33).
152. Melo Filho, E.B. Monitoring of Calcium and Strontium Carbonate Precipitation in H₂O + MEG Mixtures Using an NIR Technique / E.B. Melo Filho, F.S. Serpa, A.S. Pereira da Costa, G. Menezes Silva, J.F. do Nascimento, L. dos S. Pereira, G.R. Borges, C. Dariva, E. Franceschi // *Industrial & Engineering Chemistry Research*. — 2025. — № 3 (64). — P. 1508–1517.
153. Savkina, A.A. Impact of silver nanoparticle concentration in alginate microcapsules on their effects on morphological changes in periodontitis / A.A.

- Savkina, E. V. Lengert, A. V. Ermakov, T. V. Stepanova, A.N. Ivanov // *Saratov Medical Journal*. — 2022. — № 4 (3).
154. Zhang, X.B. EM, XPS and LEED study of deposition of Ag on hydrogenated Si substrate prepared by wet chemical treatments / X.B. Zhang, A.L. Vasiliev, G. Van Tendeloo, Y. He, L.M. Yu, P.A. Thiry // *Surface Science*. — 1995. — № 3 (340). — P. 317–327.
155. Ru, E.C. Le Quantifying SERS enhancements / E.C. Le Ru, P.G. Etchegoin // *MRS Bulletin*. — 2013. — № 8 (38). — P. 631–640.
156. Baia, L. Gold films deposited over regular arrays of polystyrene nanospheres as highly effective SERS substrates from visible to NIR / L. Baia, M. Baia, J. Popp, S. Astilean // *Journal of Physical Chemistry B*. — 2006. — № 47 (110). — P. 23982–23986.
157. Prikhodzhenko, E.S. New post-processing method of preparing nanofibrous SERS substrates with a high density of silver nanoparticles / E.S. Prikhodzhenko, V.S. Atkin, B. V. Parakhonskiy, I.A. Rybkin, A. Lapanje, G.B. Sukhorukov, D.A. Gorin, A.M. Yashchenok // *RSC Adv*. — 2016. — № 87 (6). — P. 84505–84511.
158. Lengert, E. Silver Alginate Hydrogel Micro- and Nanocontainers for Theranostics: Synthesis, Encapsulation, Remote Release, and Detection / E. Lengert, M. Saveleva, A. Abalymov, V. Atkin, P.C. Wuytens, R. Kamyshinsky, A.L. Vasiliev, D.A. Gorin, G.B. Sukhorukov, A.G. Skirtach, B. Parakhonskiy // *ACS Applied Materials and Interfaces*. — 2017. — № 26 (9). — P. 21949–21958.
159. Stetciura, I.Y. Nanoencapsulated and microencapsulated SERS platforms for biomedical analysis // *Current Opinion in Pharmacology*. — 2014.
160. Avery, L. C. *elegans* feeding — 2012. 1–23 p.
161. Shibamura, A. A method for oral administration of hydrophilic substances to *Caenorhabditis elegans*: Effects of oral supplementation with antioxidants on the nematode lifespan / A. Shibamura, T. Ikeda, Y. Nishikawa // *Mechanisms of Ageing and Development*. — 2009. — № 9 (130). — P. 652–655.
162. Pavlov, A.M. Neuron Cells Uptake of Polymeric Microcapsules and Subsequent Intracellular Release / A.M. Pavlov, A. V. Sapelkin, K.M.Y. Huang, Xinyue Huang,

A.J. Bushby, G.B. Sukhorukov, A.G. Skirtach // *Macromolecular Bioscience*. — 2011. — № 6 (11). — P. 848–854.

163. Wang, A. Capsules with silver nanoparticle enrichment subdomains and their antimicrobial properties / A. Wang, Y. Cui, Y. Yang, J. Li // *Chemistry - An Asian Journal*. — 2010. — № 8 (5). — P. 1780–1787.

164. 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. — № 35 (130). — P. 11572–3.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность:

- своему научному руководителю, Ермакову Алексею Вадимовичу, за помощь и поддержку оказанные в течение всего периода работы под его руководством, а также за мотивацию и огромное терпение.

- Горину Дмитрию Александровичу за неоценимую помощь и влияние на формирование научного опыта автора и мудрые наставления.

- Иванову Алексею Николаевичу за проведение совместных исследований, эмоциональную и информационную поддержку и помощь.

- Горячевой Ирине Юрьевне за неоценимую помощь и ценные советы, полученные в процессе совместной работы и на момент написания диссертационной работы.

- Свенской Юлии Игоревны за получение ценного опыта, возможность проведения множества исследований под ее руководством, формирование научного мышления, а также за многолетнюю всестороннюю поддержку и помощь.

- Парахонскому Богдану Владиславовичу и Скиртачу Андрею Геннадьевичу за их поддержку в формулировании и выполнении задач, проведении экспериментальной работы, а также за содействие в накоплении экспериментального опыта и развитии творческого подхода к работе.

- Научному коллективу лаборатории «Дистанционно управляемые системы для тераностики» и лаборатории биомедицинской фотоакустики Саратовского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского за дружескую атмосферу, всестороннюю помощь и поддержку на протяжении всего периода обучения и работы.

Автор выражает глубокую благодарность друзьям и близким, в особенности родителям, Ефимовой Надежде Николаевне и Ленгерт Владимиру Фридриховичу за их неоценимую моральную поддержку и всестороннюю помощь.