

**ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОЧАСТИЦ ИЗ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ПРИРОДНЫХ
И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ИХ В ОБЛАСТИ
РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ**

**М.Г. Гордиенко¹, доцент, Т.Н. Сомов^{1,@}, аспирант, Ю.С. Юсупова¹, магистр
Н.И. Чупикова², зам. ген. директора, Н.В. Меншутина¹, профессор**

¹Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,
Москва, 125480 Россия

²ООО «Клеточные Системы», Москва, 125212 Россия

@ Автор для переписки, e-mail: timofeysomov@gmail.com

Исследованы способы получения биodeградируемых микрочастиц на основе хитозана, полимолочной кислоты и желатина. Дополнительно были получены образцы микрочастиц желатина и полимолочной кислоты, покрытые коллагеном. Для сушки микрочастиц была использована лиофильная сушилка. Полученные микрочастицы были исследованы in vitro на прикрепление и рост клеток.

Ключевые слова: регенеративная медицина, микрочастицы, биodeградируемость, желатин, хитозан, полимолочная кислота.

**PREPARATION OF SPHERICAL MICROPARTICLES FROM BIODEGRADABLE
NATURAL AND SYNTHETIC POLYMERS FOR THEIR APPLICATION
IN REGENERATIVE MEDICINE**

**M.G. Gordienko¹, T.N. Somov^{1,@}, Y.S. Yusupova¹, N.I. Chupikova²,
N.V. Menshutina¹**

¹Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, 125480 Russia

²LLC «Cellular Systems», Moscow, 125212 Russia

@ Corresponding author e-mail: timofeysomov@gmail.com

We have studied methods for preparing biodegradable microparticles for regenerative medicine based on chitosan, polylactic acid, collagen and gelatin. The main methods of forming particles become emulsification, coacervation and gelation. These methods can achieve the necessary parameters of the product such as size, porosity and shape by varying process parameters such as temperature, stirring speed and the concentration of solutions. For drying the microparticles vacuum freeze drying was used, which allows to maintain the spherical shape of the particles after drying. The resulting microparticles were examined and photographed using a scanning electron microscope. To determine the cytotoxicity of the microparticles their cell growth and attachment were studied in vitro.

Keywords: regenerative medicine, microparticles, biodegradability, gelatin, chitosan, polylactic acid.

Введение

Одной из новых форм медицины является регенеративная медицина. Материалы, создаваемые для использования в регенеративной медицине, не должны быть нетоксичными, совместимыми с тканями, химически нейтральными, биodeградируемыми [1].

Выбор подходящего метода [2] для производства микрочастиц из природных и синтетических полимеров позволяет получить конечный продукт определенного размера, формы и пористости. Наиболее

предпочтительными являются частицы сферической формы, небольшого размера (порядка 100-300 мкм) и не взаимодействующие с водой [3, 4].

Основными методами получения частиц являются: эмульгирование [5, 6], распылительная сушка [7-9], коацервация [10, 11], желирование [12-15].

Каждый метод имеет свои преимущества относительно других. Например в работе [6], показано преимущество получения микрочастиц для регенеративной медицины с помощью эмульгирования по сравнению с коацервацией и желированием. В

работах [8, 9] раскрывается преимущество сушки термостабильных веществ в распылительной сушилке. Работа [11] посвящена проблемам получения микрочастиц из полимолочной кислоты. Сравнению методов эмульгирования и коацервации посвящены работы [14,15].

Целью данного исследования являлось апробация методик получения микрочастиц, взятых из литературных данных, и изучения полученных образцов *in vitro* на цитотоксичность, прикрепление и рост клеток.

Экспериментальная часть

Материалы и оборудование

В качестве основных материалов в ходе эксперимента были использованы коллаген (полученный на основе кожного покрова рыб), водорастворимый хитозан (содержание не менее 90%, ЗАО «Биопрогресс»), полимолочная кислота (M.W. 160, Sigma-Aldrich), желатин (EMPROVE exp).

В качестве дополнительных веществ были использованы растворители и связующие компоненты. В качестве связующего был выбран глутаровый альдегид (M.W. 100,12, 25%, Sigma-Aldrich). В условиях щелочного катализа глутаровый альдегид способен полимеризоваться по механизму альдольной конденсации с образованием полиглутарового альдегида, который дает необходимые химические сшивки [16]. Основными растворителями были дихлорметан, изопропанол, вода.

При проведении эксперимента были использованы центрифуга Sigma 2-16PK, верхнеприводная мешалка ИКА EuroStar 2000, ультрозвуковая ванна Сапфир 4,0, микроскоп (изображения получены на микроскопе Центра коллективного пользования РХТУ им. Д.И. Менделеева). Завершающая и основная стадия всех экспериментов была проведена в вакуумной сублимационной сушилке ScanVac CoolSafe 100-9.

Стадия вакуумной сублимационной сушки была проведена на установке CoolSafe 100-9. Данная установка позволяет проводить сушку в автоматическом режиме при заданных условиях. Полученные образцы загружаются в морозильную камеру (конденсер), где при температуре -100°C проводится длительная заморозка для создания внутри материала ровной кристаллической структуры. После заморозки образцы перемещаются из морозильной камеры в сушильную камеру. Сушильная камера представляет собой полу цилиндрическую емкость со встроенными полками с нагревательными элементами. Образцы размещаются на полках и начинается процесс сушки. Для этого открывается вакуумный клапан и происходит понижение давления с помощью вакуумного насоса. После сброса давления до 100 Па начинается

первый этап сушки, при котором на полках отключены нагревательные элементы. Дальнейшие этапы заключаются в постепенном увеличении температуры на полках для предотвращения вскипания материала. Давление внутри камеры остается постоянным. Вакуумная сублимационная сушилка с вакуумным насосом представлена на рис. 1.

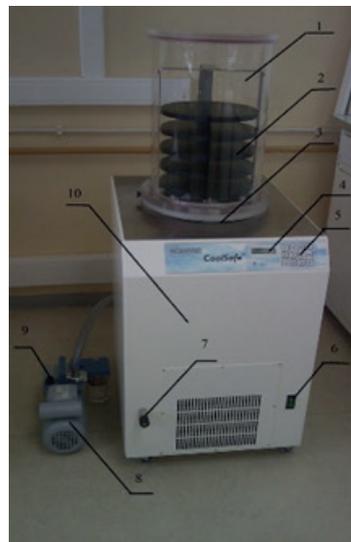


Рис. 1. Лиофильная сушилка CoolSafe 100-9: 1 – вакуумная камера; 2 – полки с подогревом; 3 – конденсор; 4 – информативный экран; 5 – устройство ввода; 6 – выключатель; 7 – спускной кран; 8 – вакуумный насос; 9 – газобалластный клапан; 10 – холодильная установка.

Методики проведения эксперимента

В ходе экспериментальных исследований были проведены эксперименты по 4 различным методикам получения микрочастиц, содержащих биополимеры. Использовались эмульсионный, суспензионный методы и метод коацервации. Отделение частиц от жидкой фазы проводилось на центрифуге. Полученные частицы промывались водой и подвергались лиофильной сушке. В каждой методике приведены точные значения времени проведения процесса, скорости вращения мешалок и центрифуг, температуры проведения процесса.

Желатиновые частицы

Частицы готовились по собственной методике, описанной в работе [17]. 18% раствор желатина нагреваются до 50°C и добавляют в него 2 мл глутарового альдегида (ГА). Полученный раствор добавляют по каплям с помощью шприца в масло, разогретое до 50°C , содержащее ПАВ, и перемешивают с целью формирования эмульсии (800 об/мин, 30 мин). Полученную эмульсию охлаждают мгновенно, поставив в емкость со льдом при перемешивании. В охлажденную эмульсию медленно вливают воду и перемешивают.

вают. Частицы переходят в водную фазу, масло сливают. Полученные частицы 3 раза промывают водой и помещают в 100 мл водного раствора глицина на 30 мин для блокировки свободных альдегидных групп, снова промывают водой. Частицы высушивают в лиофильной сушилке.

Желатиновые частицы, покрытые коллагеном

Желатиновые частицы готовятся так же, как и в предыдущей методике. Затем готовят раствор коллагена (2 мг на 1 мл 1% раствора аскорбиновой кислоты). Раствор разводят в 5 раз и смешивают с частицами в соотношении 3:1. Образец перемешивают на ледяной бане и промывают водой. Частицы погружают в 500 мл щелочного буфера (рН 9) и 100 мл раствора NaBH_4 . Полученные частицы промывают 3 раза водой и 2 раза фосфатным буфером. Частицы высушивают в лиофильной сушилке.

Микросферы полимолочной кислоты

2 г полимолочной кислоты растворяют в 40 мл метилхлорида. Готовят 2% раствор поливинилового спирта (ПВС) в воде и вливают в него ранее приготовленный раствор при перемешивании и оставляют на 24 часов для удаления растворителя. Частицы фильтруют, промывают водой. Готовятся 3% и 6% растворы гександиамина, растворы подогревают и в них добавляют частицы. Оставляют на 6 мин, затем фильтруют и несколько раз промывают водой. Полученные частицы на 10 минут помещают в 1% раствор глутарового альдегида. Далее частицы фильтруют и промывают водой. Затем частицы погружают в 5% раствор коллагена и желатина, выдерживают сутки при низкой температуре, периодически встряхивают для того, чтобы частицы не слипались при продолжительном выдерживании. После выдержки полученные частицы фильтруют, несколько раз промывают водой и подвергают лиофильной сушке.

Хитозановые частицы

Готовится 2% раствор уксусной кислоты и 100 мл 2.5% раствора хитозана. Готовят 1М растворы солей Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Раствор хитозана в уксусной кислоте делится на три части и в каждый образец вливается по 25 мл различной соли при перемешивании. После полученные растворы разливают по пробиркам и промывают водой на центрифуге. Частицы подвергаются лиофильной сушке.

Исследование на цитотоксичность и на прикрепление и рост клеток

Исследование микрочастиц на цитотоксичность проводилось в ФГБУН Институт биологии развития им Н.К. Кольцова РАН. Суть исследования заключалась в сокультивировании культуры клеток человека и полученных в ходе работы микрочастиц. В ходе

эксперимента оценивали стабильность и рН микроносителей, их цитотоксичность и способность клеточной культуры к пролиферации в присутствии микрочастиц.

Для предотвращения грибкового и бактериального заражения образцов эксперимент проводился в асептических условиях лаборатории, в боксе биологической безопасности класса II с ламинарным потоком воздуха. Для культивирования и всех манипуляций использовали одноразовый стерильный культуральный пластик. Многообразные инструменты были тщательно промыты и проавтоклавились.

На первом этапе эксперимента оценивали стабильность и рН микроносителей. Для этого в отдельные лунки 24-луночного планшета помещали по 0.1 г полученных микрочастиц, которые заливали питательной средой ДМЕМ в соотношении 1:2 (по 0.2 мл). Питательная среда представляет собой раствор определенного состава, к которому добавляются компоненты биологического происхождения (добавки плазмы, сыворотки крови, тканевые экстракты). Для приготовления питательных сред используются солевые растворы Эрла и Хенкса. Минеральные компоненты в этих растворах подобраны так, что раствор выполняет буферные функции, поддерживая постоянный кислотно-щелочной баланс среды в процессе культивирования. Постоянство рН среды является одним из главных требований условий культивирования. Например, для клонального роста диплоидных фибробластов человека оптимальны рН 7.30 ± 0.15 . Для поддержания рН и оптимальной температуры для культивирования ($+37^\circ\text{C}$) клеток млекопитающих используют CO_2 инкубатор, с содержанием CO_2 5%.

Результаты и их обсуждение

В табл. 1 дано краткое описание полученных образцов.

На рис. 2 представлены желатиновые частицы, а также желатиновые частицы, покрытые коллагеном с различным содержанием глутарового альдегида. Фотографии (рис. 2 и рис. 4) были получены методом сканирующей электронной микроскопии на оборудовании Центра коллективного пользования РХТУ им. Д.И. Менделеева.

По итогам эксперимента было определено, что желатиновые частицы с меньшим содержанием глутарового альдегида более сферичны, чем частицы с большим содержанием глутарового альдегида. С увеличением количества сшивающего агента частицы принимают гантелеобразную форму.

При контакте с водой желатиновые частицы не растворялись, что может свидетельствовать о полном протекании реакции сшивки с глутаровым альдегидом, и восстанавливали сферическую форму. Желатиновые частицы, покрытые коллагеном, также оставались стабильными при контакте с водной фазой. На рис. 3 приведены образцы при контакте с водой.

Таблица 1. Описание полученных образцов

№	Краткое описание	Примечание
1		Химическая сшивка: 0.5 мл р-ра ГА
2	Желатиновые микрочастицы	Химическая сшивка: 1 мл р-ра ГА
3		Химическая сшивка: 2 мл р-ра ГА
4	Образец № 1, покрытый коллагеном	
5	Образец № 2, покрытый коллагеном	
6	Образец № 3, покрытый коллагеном	
7	Микрочастицы ПМК, покрытые коллагеном	Использовали 3% р-р гександиамина
8		Использовали 6% р-р гександиамина
9	Микрочастицы ПМК, покрытые желатином	Использовали 3% р-р гександиамина
10		Использовали 6% р-р гександиамина
11		раствор Na_2SO_4
12		раствор Na_2SO_4 + р-р ГА
13		раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
14	Хитозановые микрочастицы	раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + р-р ГА
15		раствор $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
16		раствор $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ + р-р ГА

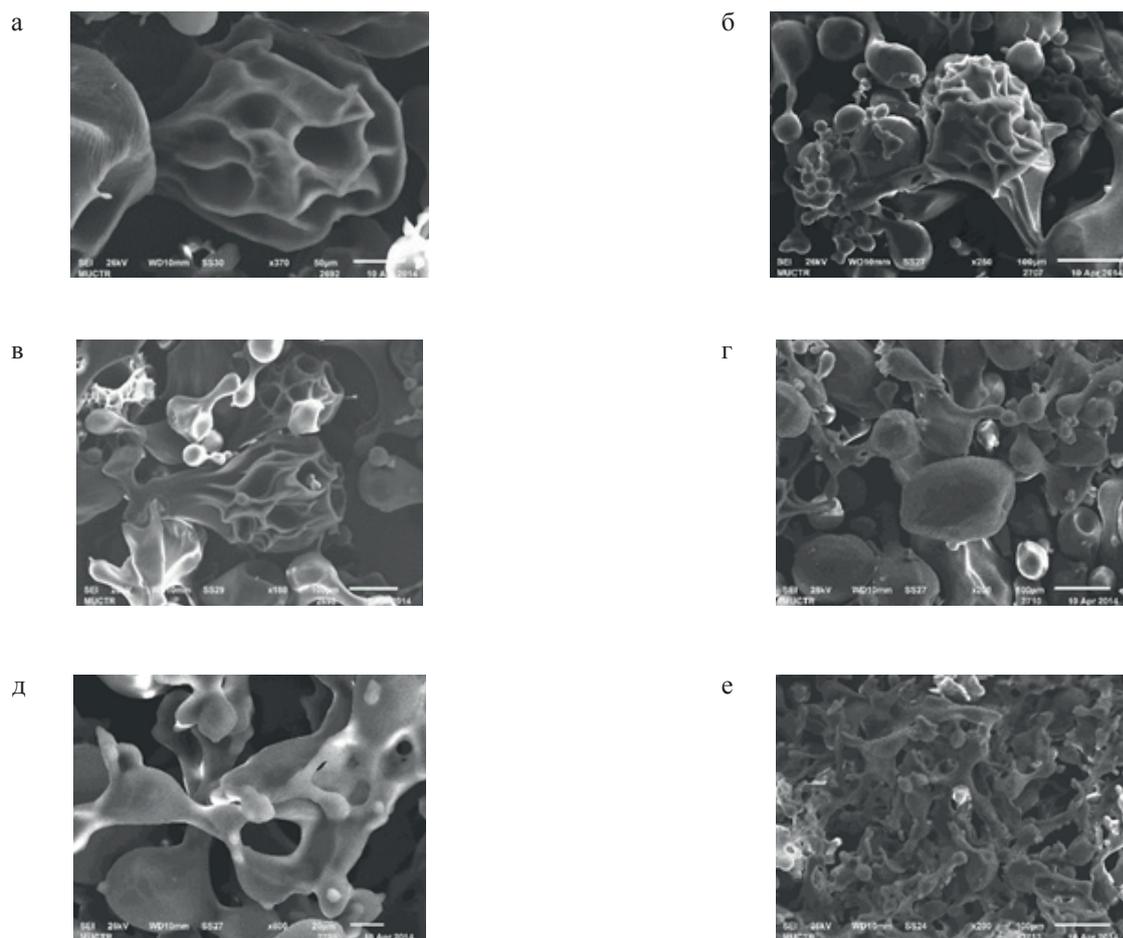


Рис. 2. СЭМ-изображения: а, в, д – желатиновые частицы (0.5 мл ГА, 1мл ГА, 2 мл ГА); б, г, е – желатиновые частицы, покрытые коллагеном (0.5 мл ГА, 1мл ГА, 2 мл ГА). Измерения выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования РХТУ им. Д.И. Менделеева.

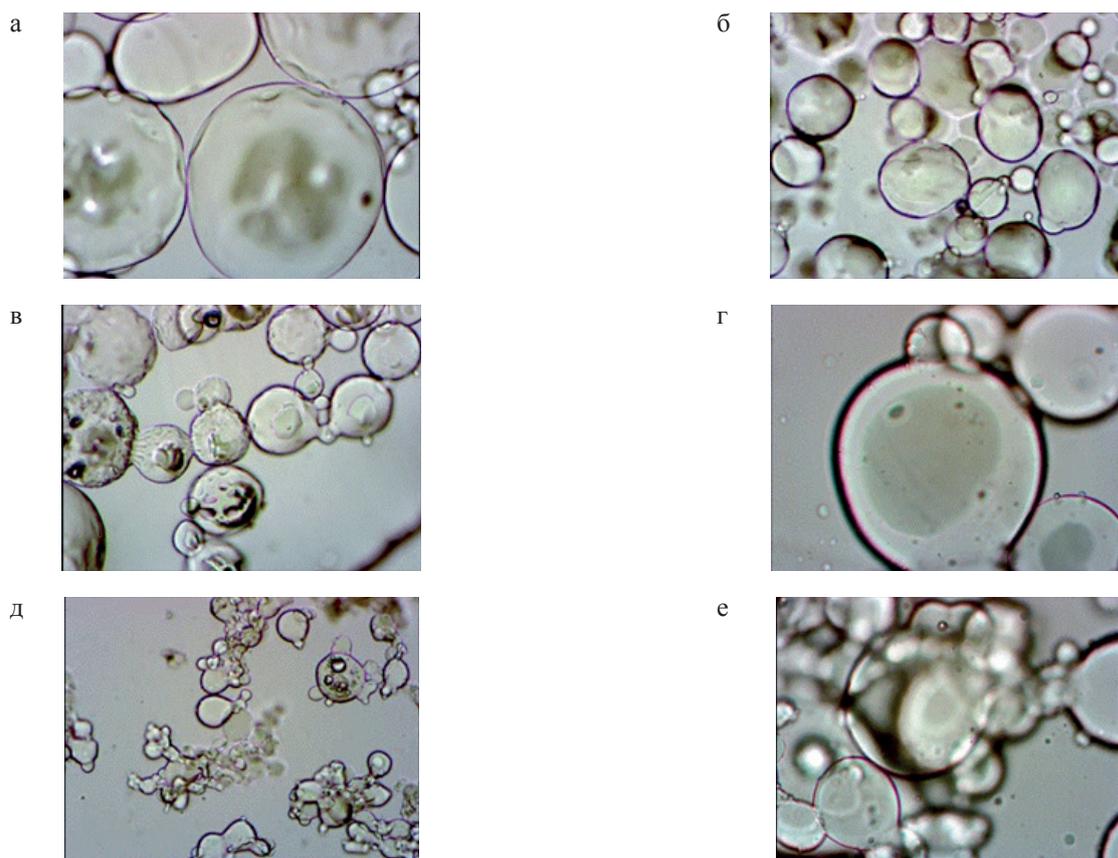


Рис. 3. а, в, д – желатиновые частицы при контакте с водой (0.5 мл ГА, 1мл ГА, 2 мл ГА); б, г, е – желатиновые частицы, покрытые коллагеном, при контакте с водой (0.5 мл ГА, 1мл ГА, 2 мл ГА).

Из всех частиц наиболее актуальными для выращивания клеток являются частицы полимолочной кислоты, поскольку они имеют сферическую форму, что наибольшим образом способствует к прикреплению клеток. Полученные частицы ПМК были покры-

ты коллагеном и желатином с применением химической сшивки при помощи гександиамина, взятого в разных концентрациях (табл. 1). На рис. 4 приведены фотографии частиц ПМК.

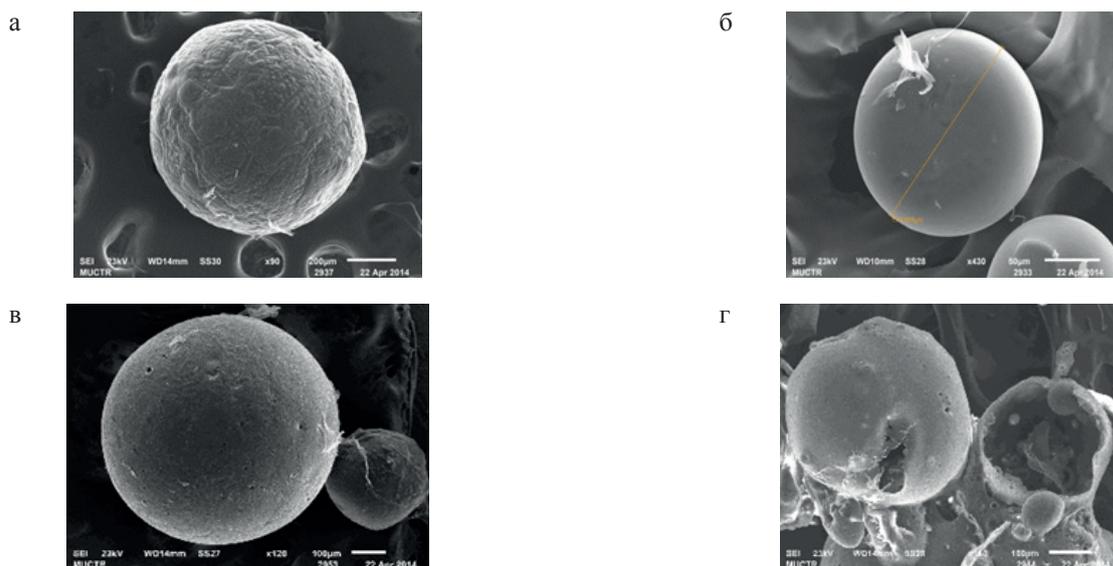


Рис. 4. СЭМ-изображения образцов:
а, б – частицы ПМК, покрытые коллагеном (3% раствор гександиамина, 6% раствор гександиамина);
в, г – частицы ПМК, покрытые желатином (3% раствор гександиамина, 6% раствор гександиамина).
Измерения выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Частицы полимолочной кислоты получились сферической формы, слегка шероховатые. При контакте с водой не растворялись, оставались стабильными.

Поверхность частиц хитозана неоднородная,

рассыпчатая. После сублимационной сушки получился белый мелкодисперсный порошок. При контакте с водой слегка растворялись. Хитозановые частицы представлены на рис. 5.

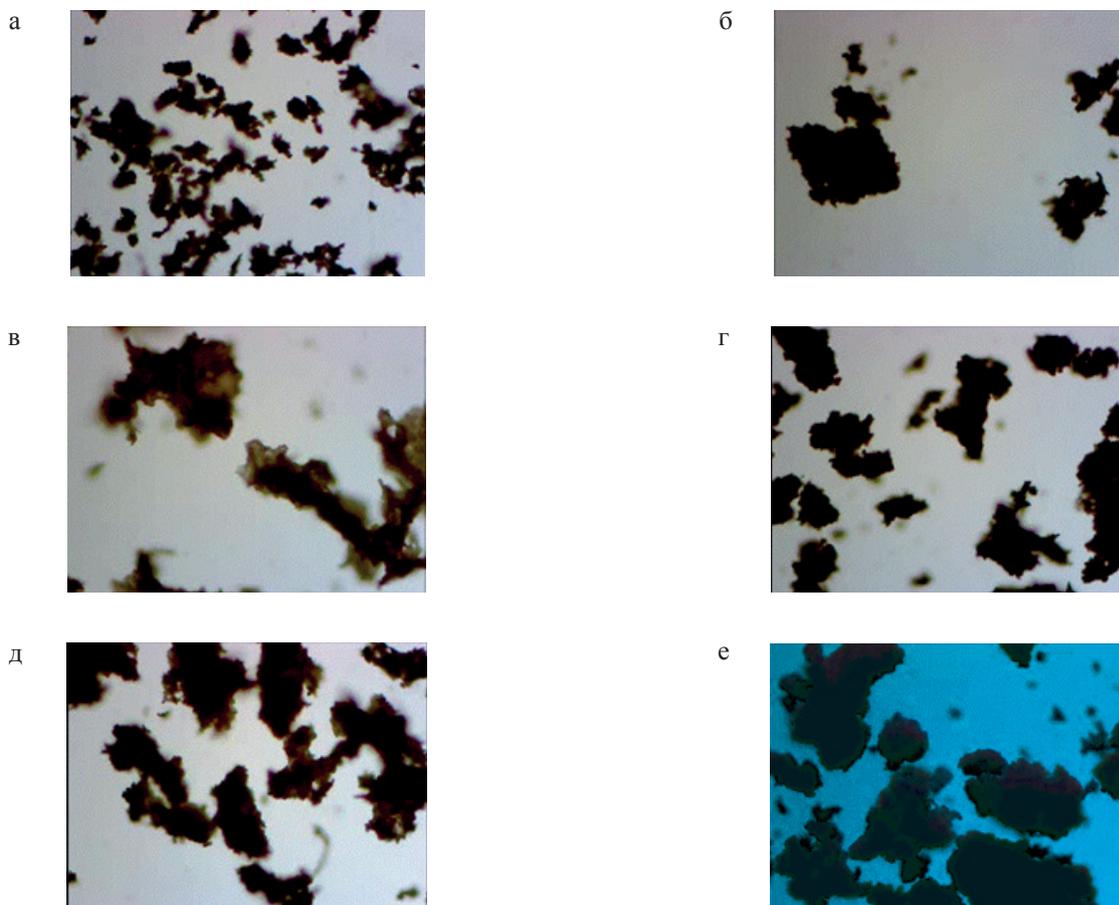


Рис. 5. СЭМ-изображения образцов: а, в, д – хитозановые частицы, полученные при взаимодействии с солями $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ соответственно; б, г, е – хитозановые частицы, полученные при взаимодействии с солями $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ соответственно (сшивающий агент глутаровый альдегид).

На рис. 6 показаны микрочастицы перед и после добавления питательной среды ДМЕМ.



Рис. 6. Микрочастицы в культуральном планшете.

Желатиновые микрочастицы после добавления раствора ДМЕМ образуют гелеобразную структуру. Микрочастицы ПМК плохо смачиваются, плавают на поверхности среды. Хитозановые микрочастицы выпадают в осадок.

На втором этапе исследований изучали влияние микрочастиц на рост и пролиферацию клеток в условиях *in vitro*. На рис. 7 представлена культура постнатальных фибробластов человека (ПФЧ) для исследования микрочастиц. Это клетки соединительной ткани человека, адгезивные к культуральному пластику и способные к пролиферации в условиях *in vitro*, что делает их доступным объектом для исследований. В экспериментах оценивали цитотоксичность изучаемых образцов, руководствуясь требованиями методических рекомендаций*.

За сутки до эксперимента культура ПФЧ была внесена в культуральные лунки в концентрации 3000 кл./см² в среде ДМЕМ. Микрочастицы вносили в лунки с клетками через сутки. Влияние на жизнеспособность

и пролиферацию клеточной культуры оценивали через два часа после сокультивирования, через сутки и через трое суток в нативных препаратах с помощью инвертированного микроскопа.

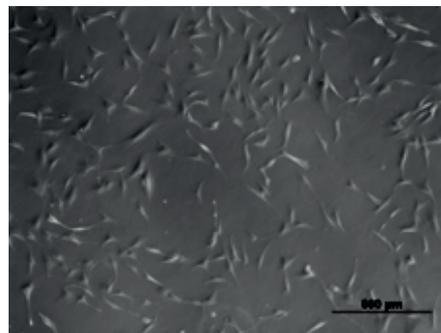


Рис. 7. Культура постнатальных фибробластов человека.

На рис. 8 приведены фотографии образцов желатиновых микрочастиц.

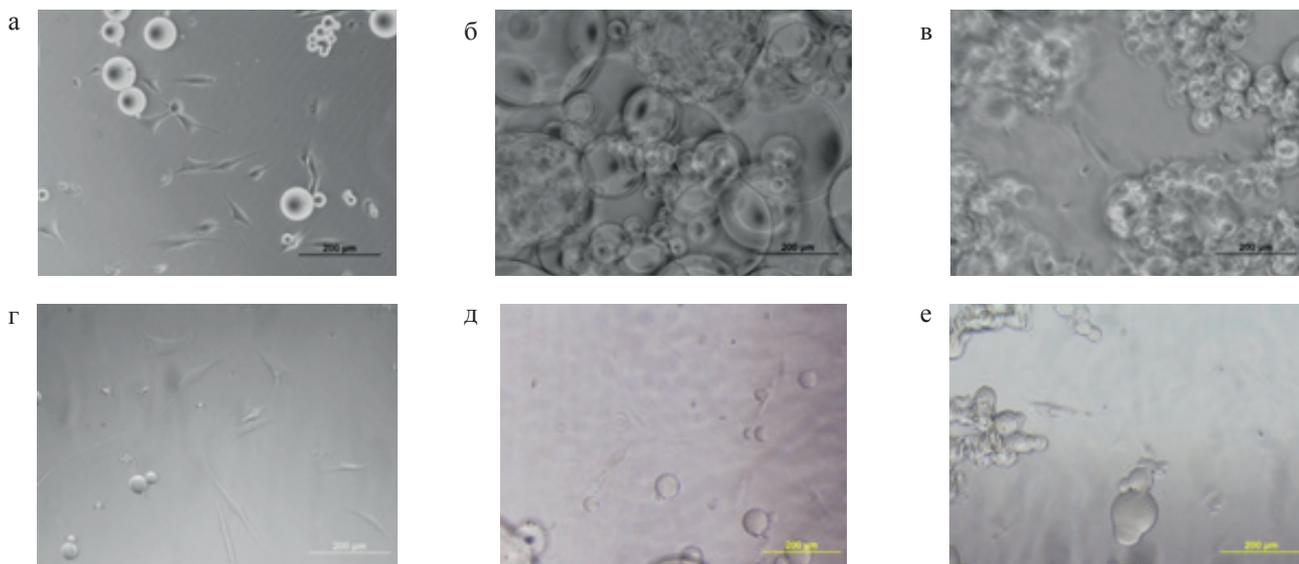


Рис. 8. Культура ПФЧ при сокультивировании с желатиновыми микрочастицами:

а, б, в – после первых суток (содержание раствора ГА 0.5 мл, 1 мл, 2 мл);
г, д, е – после третьих суток (содержание раствора ГА 0.5 мл, 1 мл, 2 мл).

По результатам эксперимента выявлено цитотоксическое действие носителей на культуру ПФЧ. Тестируемые образцы 2 и 3, внесенные в культуру эмбриональных фибробластов человека, оказались цитотоксичными, в результате совместного культивирования на первые сутки была выявлена 70% гибель клеток. Образец 1 (с меньшим содержанием ГА) является менее цитотоксичным.

Для дальнейшего внедрения и использования данных микрочастиц в практике необходимо:

- снижение концентрации ГА в ходе получения микрочастиц;
- перед использованием микрочастицы необ-

ходимо несколько раз промыть в культуральной среде для получения нейтрального рН.

На рис. 9 приведены фотографии образцов желатиновых микрочастиц, покрытых коллагеном после первых и третьих суток культивирования.

Образцы 4-6 ведут себя аналогично образцам 1-3. Образец 4 (с меньшим содержанием раствора ГА) является менее цитотоксичным, а образцы 5 и 6, внесенные в культуру эмбриональных фибробластов человека, оказались цитотоксичными, в результате совместного культивирования на первые сутки была выявлена 80% гибель клеток.

*Методические рекомендации 96/247 «Тестирование лекарственных препаратов наружного применения в культуре клеток кожи человека», утвержденные МЗ РФ.

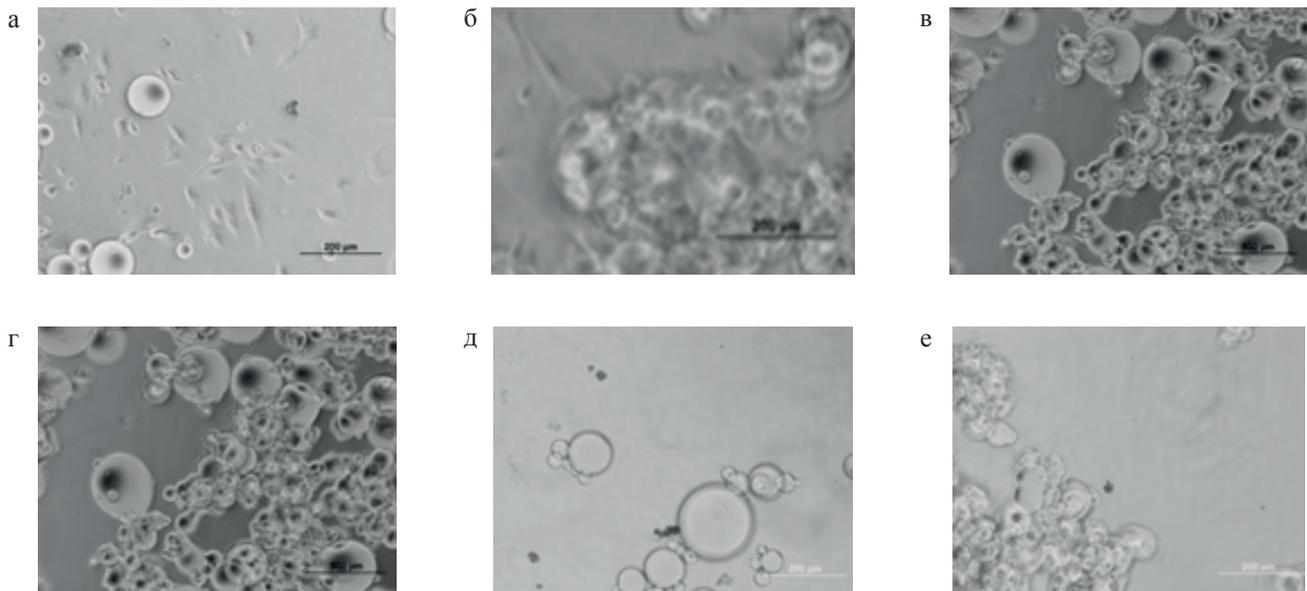


Рис. 9. Культура ПФЧ при сокультивировании с желатиновыми микрочастицами, покрытыми коллагеном:
 а, б, в – после первых суток (содержание раствора ГА 0.5 мл, 1 мл, 2 мл);
 г, д, е – после третьих суток (содержание раствора ГА 0.5 мл, 1 мл, 2 мл).

На рис. 10 приведены результаты сокультивирования ПФЧ и образцов микрочастиц ПМК, покрытых коллагеном. Проведенная серия экспериментов позволяет утверждать, что микрочастицы ПМК, покрытые коллагеном, проявили низкий уровень цитотоксичности: так, после первых суток большинство клеток являются

жизнеспособными, а после третьих суток наблюдается незначительное уменьшение количества живых клеток и появление мертвых клеток.

На рис. 11 приведены результаты сокультивирования ПФЧ и образцов микрочастиц ПМК, покрытых желатином.

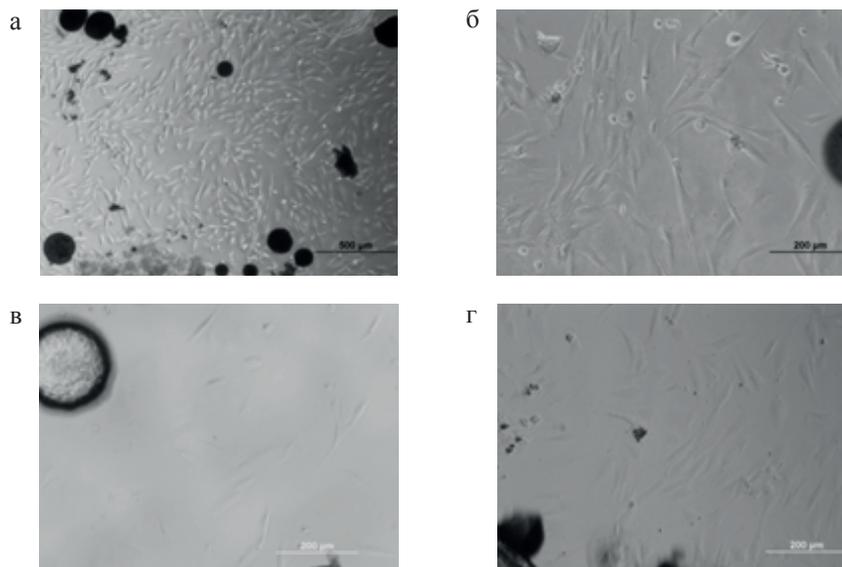


Рис. 10. Культура ПФЧ при сокультивировании с микрочастицами ПМК, покрытыми коллагеном:
 а, б – после первых суток (3% раствор гександиамина, 6% раствор гександиамина);
 в, г – после третьих суток (3% раствор гександиамина, 6% раствор гександиамина).

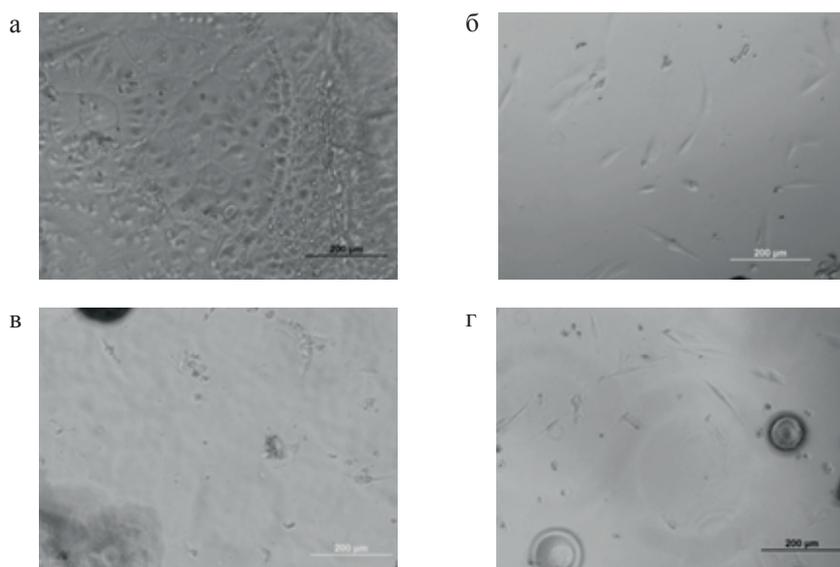


Рис. 11. Культура ПФЧ при сокультивировании с микрочастицами ПМК, покрытыми желатином: а, б – после первых суток (3% раствор гександиамина, 6% раствор гександиамина); в, г – после третьих суток (3% раствор гександиамина, 6% раствор гександиамина).

Микрочастицы ПМК, покрытые желатином, проявили более высокий уровень цитотоксичности, чем микрочастицы ПМК, покрытые коллагеном. После третьих суток только на микрочастицах ПМК, покрытых желатином (6% раствор гександиамина), клетки были жизнеспособными. Таким образом, дан-

ный тип микрочастиц не является цитотоксичным и может быть использован для проведения дальнейших исследований.

На рис. 12 приведены результаты сокультивирования ПФЧ с образцами хитозановых микрочастиц.

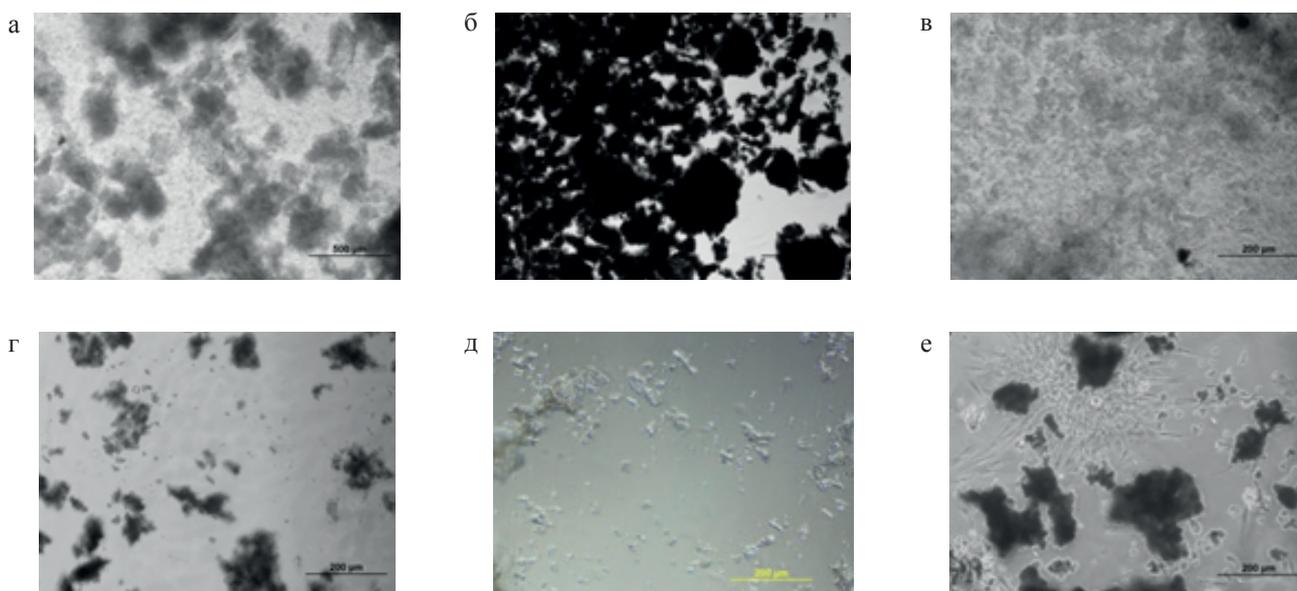


Рис. 12. Культура ПФЧ при сокультивировании с образцами хитозановых микрочастиц через 1 сутки: а, в, д – хитозановые частицы, полученные при взаимодействии с солями $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; б, г, е – хитозановые частицы, полученные при взаимодействии с солями $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, сшивающий агент ГА).

Исходя из проведенных экспериментов, можно утверждать, что хитозановые микрочастицы проявили высокий уровень цитотоксичности, за исключением образца 16 с

раствором $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (сшивающий агент ГА).

В табл. 2 приведены основные характеристики полученных частиц.

Таблица 2. Характеристики полученных частиц

№	Форма	Размер, мкм	Взаимодействие с водой
1	Гантелеобразная	50 – 150	Не растворяются
2	Гантелеобразная	50 – 150	Не растворяются
3	Гантелеобразная	50 – 150	Не растворяются
4	Гантелеобразная	50 – 150	Не растворяются
5	Гантелеобразная	50 – 150	Не растворяются
6	Гантелеобразная	50 – 150	Не растворяются
7	Сферичная	200 – 300	Не растворяются
8	Сферичная	200 – 300	Не растворяются
9	Сферичная	200 – 300	Не растворяются
10	Сферичная	200 – 300	Не растворяются
11	Неоднородная	100 – 150	Слегка растворяются
12	Неоднородная	100 – 150	Слегка растворяются
13	Неоднородная	100 – 150	Слегка растворяются
14	Неоднородная	100 – 150	Слегка растворяются
15	Неоднородная	100 – 150	Слегка растворяются
16	Неоднородная	100 – 150	Слегка растворяются

Заключение

По результатам анализа таблицы 2 можно сделать выводы, что наиболее предпочтительными микрочастицами являются микрочастицы полимолочной кислоты. Они сферичны, имеют приемлемый размер, не реагируют с водой. Желатиновые микрочастицы при больших концентрациях глутарового альдегида начинают терять сферичность. Те же микрочастицы, покрытые коллагеном, проявляют такую же тенденцию, что говорит о чрезмерном действии сшивающего агента. Хитозановые микрочастицы не имеют четко выраженной формы, а также под действием влаги начинают растворяться, что говорит о плохой сшивающей способности.

При проведении эксперимента по высадке клеток наименьшую токсичность проявили следующие микрочастицы:

- Желатиновые микрочастицы (0.5 мл р-ра ГА)
- Желатиновые микрочастицы, покрытые коллагеном (0.5 мл р-ра ГА)
- Микрочастицы ПМК, покрытые коллагеном (3% и 6% р-р гександиамина)
- Микрочастицы ПМК, покрытые желатином (6% р-р гександиамина)
- Хитозановые микрочастицы (р-р $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ + ГА)

Дальнейшие исследования будут заключаться в проведении экспериментов на лабораторных животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках базовой части государственного задания.

Список литературы / References:

1. Prafulla C., Yoo J.J., Lee S.J. Biomaterials in Regenerative Medicine: Challenges in Technology Transfer from Science to Process Development / In: Translational Regenerative Medicine. 2015. P. 151–157.
2. Chau D.Y.S., Agashi K., Shakesheff K.M. // Materials Sci. & Technol. 2008. V. 24. P. 1031–1044.
3. Whittlesey K.J., Shea L.D. // Exp. Neurology. 2004. V. 190. P. 1–16.
4. Watts P.J., Davies M.C., Melia C.D. // Crit. Rev. in Therapeutic Drug Carrier Systems. 1990. V. 7. P. 235–259.
5. Ogawa Y., Yamamoto M., Takada S., Okada H., Shimamoto T. // Chem. Pharm. Bull. 1988. V. 36. P. 1502–1507.
6. Hou Q., De Bank P.A., Shakesheff K.M. // J. Mater. Chem. 2004. V. 14. P. 1915–1923.
7. Masters K. Spray Drying Handbook: 4th ed. Bath: The Pitman Press Pitman, 1985. 696 p.
8. Wagenaar B.W., Müller B.W. // Biomaterials. 1994. V. 15. P. 49–54.
9. Berkland C., Kim K., Pack D.W. // J. Contr. Release. 2001. V. 73. P. 59–74.
10. Jain R.A. // Biomaterials. 2000. V. 21. P. 2475–2490.
11. Jalil R., Nixon J.R. // J. Microencapsulation. 1990. V. 7. P. 297–325.

12. Vasir J.K., Tambwekar K., Garg S. // *Int. J. Pharm.* 2003. V. 255. P. 13–32.
13. Wu T.J., Huang H.H., Hsu Y.M., Lyu S.R., Wang Y.J. // *Biotechnol. Bioeng.* 2007. V. 98. P. 578–585.
14. Zimmermann H., Shirley S. G., Zimmermann U. // *Curr. Diabetes Rep.* 2007. V. 7. P. 314–320.
15. Reis P.C., Neufeld R.J., Vilela S., Ribeiro A.J., Veiga F. // *J. Microencapsulation.* 2006. V. 23. P. 245–257.
16. Haug I.J., Draget K.I. Gelatin / In: *Handbook of Food Proteins.* 2011. P. 92–115.
17. Стариков Д.Г., Сомов Т.Н. // *Успехи в химии и хим. технологии.* 2013. Т. XXVII. № 1. С. 74–79.
- Starikov D.G., Somov T.N. // *Uspekhi v khimii i khim. tekhnologii (Advances in chemistry and chemical technology).* 2013. V. XXVII. № 1. P. 74–79.