

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Естифеева Татьяна Михайловна

Получение и физико-химические параметры микропузырьков на основе комплексов альбумина со стабилизирующими добавками для повышения контраста ультразвуковой визуализации

Специальность 1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2026

Диссертация подготовлена в лаборатории биофотоники Центра фотоники и фотонных технологий Сколковского института науки и технологий

Научные руководители: *Горин Дмитрий Александрович* – доктор химических наук, профессор
Рудаковская Полина Григорьевна – кандидат химических наук

Официальные оппоненты: *Марквичева Елена Арнольдовна* – доктор химических наук, Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории биомедицинских материалов
Мелик-Нубаров Николай Сергеевич – доктор химических наук, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра высокомолекулярных соединений, ведущий научный сотрудник
Никольская Елена Дмитриевна – кандидат химических наук, Институт биохимической физики имени Н. М. Эмануэля Российской академии наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией количественной онкологии

Защита диссертации состоится «22» сентября 2026 года в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ 014.4 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 11Б, аудитория 202.

Email: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на портале:

<https://dissovet.msu.ru/dissertation/4034>

Автореферат разослан «__» августа 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

И. М. Ле-Дейген

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Ультразвуковая диагностика (УЗ) — один из наиболее распространённых методов медицинской визуализации благодаря неинвазивности и глубине проникновения в биологическую ткань, сочетающий эти достоинства с безопасностью и возможностью проведения многократных измерений. К недостаткам данного метода стоит отнести низкое пространственное разрешение и недостаточный контраст получаемых изображений сосудов и органов на глубине, в следствии сильного затухания ультразвукового сигнала. В последние годы развитие ультразвуковых технологий направлено на создание контрастных агентов, способных повысить информативность УЗ-исследований и увеличить время визуализации кровотока и органов с высоким контрастированием. Газонаполненные микропузырьки (МП) обеспечивают высокую чувствительность визуализации, поскольку их акустический отклик и стабильность в организме определяются физико-химическими характеристиками межфазной оболочки [1]. Существуют липидные, полимерные и белковые МП. Липидные МП дают интенсивный акустический отклик, однако обладают ограниченной механической прочностью. Полимерные МП характеризуются большей долговечностью и устойчивостью к схлопыванию, но жёсткость их оболочки снижает амплитуду акустического сигнала [2].

Белковые МП на основе альбумина привлекают значительное внимание как биосовместимые ультразвуковые контрастные агенты. Первые клинически одобренные препараты данного типа (Альбунекс, Оптисон) были основаны на человеческом сывороточном альбумине (ЧСА). В экспериментальных исследованиях широко используется бычий сывороточный альбумин (БСА) как доступная и хорошо охарактеризованная модельная белковая система для получения микропузырьков с регулируемыми свойствами оболочки. Тем не менее ограниченная стабильность в физиологических условиях и кратковременность эхосигнала сдерживают их широкое применение. Показано, что устойчивость альбуминовых микропузырьков существенно зависит от степени сохранения нативной структуры белка [3]. Поэтому разработка новых формуляций МП с повышенной устойчивостью и контролируемыми межфазными свойствами остаётся актуальной задачей.

Материал оболочки и метод получения определяют коллоидные и акустические характеристики микропузырьков. Несмотря на статус эталона биосовместимости, белковые МП уступают липидным и полимерным системам по воспроизводимости и стабильности. Оптимизация получения МП лишь частично устраняет это различие, поэтому активно исследуются методы химической модификации оболочек. Для повышения прочности применяются малые молекулы, например глутаровый альдегид, обеспечивающий сшивку белковых цепей; однако такие подходы могут сопровождаться потерей нативной структуры белка и появлением цитотоксичности.

Сохранность конформации альбумина в межфазной оболочке является ключевым условием его функциональной активности и биосовместимости, что стимулировало развитие макромолекулярных или супрамолекулярных стратегий, позволяющих регулировать состав и упругость межфазного слоя и адаптировать физико-химические свойства микропузырьков. При этом существующие подходы к получению белково-полимерных систем, например PB127 (альбумин–полимолочная кислота), прошедших II фазу клинических испытаний, лишь частично решают задачу устойчивости и не являются универсальными [4].

Таким образом, создание устойчивых микропузырьков на основе альбумина с контролируемой конформацией белка и стабилизирующими добавками различной природы является актуальной задачей современной биотехнологии, направленной на разработку эффективных ультразвуковых контрастных агентов [5].

Степень разработанности темы

В настоящее время в научной литературе представлено большое количество работ, посвящённых газонаполненным микропузырькам как ультразвуковым контрастными агентами. Показано, что их высокая экзогенность обусловлена значительным различием акустических свойств газа и биологических тканей, а также нелинейным характером колебаний микропузырьков в ультразвуковом поле [1]. Наиболее подробно изучены МП с липидными, полимерными и белковыми оболочками, для которых установлено, что устойчивость и акустический отклик определяются физико-химическими свойствами межфазного слоя [2]. МП на основе альбумина характеризуются высокой биосовместимостью, однако обладают ограниченной стабильностью и воспроизводимостью [3]. Параллельно в литературе активно развиваются исследования белково-полимерных комплексов в растворе. Показано, что их структура определяется балансом электростатических и гидрофобных взаимодействий, а также молекулярными параметрами полимера [6]. Однако связь этих двух направлений исследований разработана фрагментарно. Несмотря на наличие отдельных работ, посвящённых использованию белково-полимерных систем при формировании микропузырьков, систематические исследования, устанавливающие взаимосвязь между структурой полимеров и комплексов в растворе, свойствами межфазной оболочки и их акустическими характеристиками, в литературе отсутствуют. Кроме того, механизмы образования микропузырьков из предварительно сформированных комплексов, включая роль кавитационной стадии и формирование распределения газонаполненных прекурсоров по размерам, остаются недостаточно изученными [4].

Таким образом, вопросы о переносе закономерностей комплексообразования в растворе на формирование и свойства микропузырьков, а также о создании стабильных и эффективно контрастирующих

микропузырьков остаются открытыми, что определяет актуальность настоящего диссертационного исследования.

Целью работы являлось получение микропузырьков на основе комплексов альбумина со стабилизирующими добавками различной природы и установление взаимосвязи между их составом, физико-химическими параметрами, устойчивостью, временем циркуляции и эффективностью ультразвукового контрастирования.

Для реализации цели работы необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Установить влияние стабилизирующих добавок различной природы, их молекулярной массы, типа концевых групп и массового соотношения с альбумином на образование микропузырьков, их концентрацию, распределение по размерам и коллоидную стабильность. Исследовать системы на основе комплексов альбумина с амфифильным сополимером N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты, а также со спермином, и провести сравнение с микропузырьками из чистого альбумина и коммерческим контрастным агентом Оптисон (оболочка – альбумин, газовое ядро – октафлуоропропан).
2. Изучить конформационное состояние альбумина при образовании комплексов и межфазной оболочки микропузырьков методами инфракрасной Фурье-спектроскопии и кругового дихроизма.
3. Оценить интенсивность нелинейного акустического сигнала и длительность контрастирования микропузырьков *in vitro* и *in vivo* в сравнении с коммерческим контрастным агентом Оптисон.
4. Оценить биосовместимость и биораспределение микропузырьков по гематологическим показателям крови и данным *ex vivo* флуоресцентной томографии у малых лабораторных животных (крыс).
5. Оценить влияние микропузырьков на агрегацию, деформируемость эритроцитов и критическое напряжение сдвига в цельной крови человека.

Научная новизна

1. Разработан физико-химический подход к стабилизации газонаполненных микропузырьков на основе альбумина, основанный на регулировании электростатических и гидрофобных взаимодействий в межфазной оболочке за счёт комплексообразования белка с амфифильным сополимером N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты, а также с низкомолекулярным полиамином спермином. Подход позволил впервые получить устойчивые водные суспензии белково-композитных микропузырьков с высокой концентрацией.
2. Впервые установлены структурные закономерности формирования межфазной оболочки микропузырьков на основе альбумина и его

комплексов с стабилизаторами различной природы. Показано, что оболочка формируется преимущественно из молекул альбумина с сохранённой α -спиральной структурой, тогда как частично денатурированные белковые фракции не встраиваются в оболочку, что определяет биосовместимость полученных систем.

3. Установлена взаимосвязь между составом, структурой и свойствами белково-полимерных систем на основе альбумина и сополимера N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой. Показано определяющее влияние молекулярной массы сополимера и строения концевой гидрофобной группы (октильной и октадецильной) на самоорганизацию комплексов, их межфазную активность, выход микропузырьков, их размер и морфологию. Сформирована параметрическая карта, позволяющая варьировать условия синтеза с целью получения микропузырьков с заданными физико-химическими свойствами.
4. Предложенный подход к получению микропузырьков позволяет обеспечивать сохранение нативноподобной структуры альбумина и пролонгированный эхоконтраст *in vivo* при сохранении их биосовместимости, а также повысить устойчивость микропузырьков.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в разработке физико-химического подхода к формированию белково-композитных микропузырьков на основе управляемого комплексообразования альбумина с макромолекулярными и низкомолекулярными модификаторами. Установленные взаимосвязи «состав–структура–свойство» и выявленные закономерности формирования межфазной оболочки создают научную основу для направленного регулирования коллоидных и акустических характеристик микропузырьков.

Практическая значимость работы заключается в разработке методологии получения белково-композитных микропузырьков с регулируемыми акустическими свойствами, обеспечивающих усиление акустического отклика и пролонгированный эхосигнал по сравнению с традиционными альбуминовыми контрастными агентами. Разработанные системы могут быть использованы как контрастные агенты для ультразвуковой диагностики, а также как платформы для реализации сонопермеации. Проведённые исследования гемосовместимости и реологических свойств крови человека *ex vivo*, гематологических показателей крови животных и биораспределения микропузырьков *in vivo* показали отсутствие выраженного негативного влияния разработанных систем на кровь и внутренние органы, что подтверждает перспективность их дальнейшего биомедицинского применения. Результаты проведённого исследования позволяют сформулировать важные принципы направленного регулирования коллоидных, межфазных и акустических свойств микропузырьков за счёт контролируемого комплексообразования белка с макромолекулярными и низкомолекулярными модификаторами.

Практическая значимость работы подтверждается получением патента РФ на изобретение «Новые МП с белково-композитной оболочкой для ультразвуковой диагностики и терапии» (№ 2861700, выдан 07.05.2026).

Положения, выносимые на защиту

1. Использование в качестве оболочки микропузырьков комплексов альбумина с амфифильным сополимером N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты с октилмеркаптановой концевой группой и молекулярной массой 8,5 кДа при массовом соотношении белок:сополимер 5:1 и комплексов альбумина со спермином при массовом соотношении 10:1 позволяет достичь 100-кратного увеличения количества микропузырьков с узким распределением по размерам ($2,3 \pm 1,2$ мкм и $0,8 \pm 0,2$ мкм, соответственно) по сравнению с микропузырьками с оболочкой на основе альбумина и позволяет сохранять на 90% нативную структуру альбумина в составе оболочки микропузырьков.
2. Использование комплексов альбумина с сополимером N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты в качестве оболочки микропузырьков увеличивает интенсивность акустического сигнала в нелинейном контрастном режиме в 4-6 раз и позволяет увеличивать время наблюдения сигнала в 5 раз (с 2 до 10 минут) по сравнению с коммерческим препаратом Оптисон в модельной системе кровеносного русла человека.
3. Использование комплексов альбумина с амфифильным сополимером N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты в качестве оболочки микропузырьков обеспечивает гемосовместимость и отсутствие выраженных изменений гематологических показателей крови малых лабораторных животных (крысы) при внутривенном введении и 5-кратное увеличение интенсивности акустического сигнала в нелинейном контрастном режиме на 1-й минуте по сравнению с Оптисоном, и сохранение двухкратного усиления интенсивности акустического сигнала спустя 5 минут после внутривенного введения в сравнении с микропузырьками на основе комплексов альбумина и спермина в условиях эхокардиографии *in vivo*.
4. Введение в цельную человеческую кровь *ex vivo* микропузырьков на основе комплексов альбумина с амфифильным сополимером N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты и альбумина со спермином при варьировании концентрации от 10^5 до 10^7 МП/мл сохраняет уровень агрегации и деформируемости эритроцитов при низком (3 Па) и высоком (20 Па) сдвиговом напряжении.

Личный вклад автора

Представленные в работе результаты получены автором лично либо при его непосредственном участии на всех этапах исследования под научным руководством кандидата химических наук П. Г. Рудаковской и доктора химических наук Д. А. Горина. Автором самостоятельно проведён анализ современной научной литературы по теме диссертации и подготовлен обзор

литературы. Автор принимал участие в постановке экспериментальных задач, планировании экспериментов, им лично были получены микропузырьки на основе альбумина и его комплексов со стабилизирующими добавками, проведена оптимизация условий синтеза, а также выполнен основной объём экспериментов по физико-химической и акустической характеристике исследуемых систем. Автором самостоятельно выполнены обработка, статистический анализ и интерпретация полученных результатов, подготовка публикаций и текста диссертации. На защиту вынесены только те положения и результаты, в получении которых вклад автора являлся определяющим.

Методология и методы исследования. Методологическая основа диссертационной работы представлена анализом современной научной литературы по изучаемой проблеме формирования и стабилизации газонаполненных белково-композитных микропузырьков, а также комплексом физико-химических, спектроскопических, микроскопических, акустических и биомедицинских методов исследования. В работе использованы следующие основные методы и подходы: синтез сополимеров П(ВП-АК) методом радикальной сополимеризации; получение белково-композитных комплексов и микропузырьков методом контролируемого комплексообразования и ультразвуковой обработки; титриметрический анализ, ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия, ДСР, измерение поверхностного натяжения, ИК-Фурье, КД и флуоресцентная спектроскопия; ОМ, СЭМ, КЛСМ, АСМ и крио-ПЭМ; молекулярно-динамическое моделирование; исследование акустического отклика *in vitro*, анализ кавитационной активности и высокоскоростная видеорегистрация; лазерная агрегометрия и эктацитометрия для оценки реологических свойств крови; *in vivo* УЗ-визуализация, гематологический анализ и *ex vivo* исследование биораспределения с использованием системы IVIS.

Степень достоверности и апробация работы

Степень достоверности представленных количественных данных определяется инструментальной погрешностью использованного аналитического оборудования и статистической обработкой полученных результатов. Результаты работы были представлены и обсуждены на следующих российских и международных конференциях: Международная научно-практическая конференция «Материаловедение, формообразующие технологии и оборудование» (ICMSSTE 2022), Ялта, Россия, 16–19 мая 2022 г.; Saratov Fall Meeting, Саратов, Россия, 26–30 сентября 2022 г.; VI Международная конференция по коллоидной химии и физико-химической механике (IC-CCPCM), Казань, Россия, 23–26 октября 2023 г.; Saratov Fall Meeting, Саратов, Россия, 25–29 сентября 2023 г.; Ежегодная молодежная конференция с международным участием «Биохимическая физика», Москва, Россия, 2024 г.; XXXVI Симпозиум «Современная химическая физика», Туапсе, Россия, 16–26 сентября 2024 г.; Saratov Fall Meeting, Саратов, Россия, 23–27 сентября 2024 г.; Саммит разработчиков лекарственных препаратов «Сириус.Биотех», Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, Россия, 21–23 мая 2025 г.

Публикации

Основные положения, результаты и выводы диссертации отражены в 5 научных трудах, 5 из которых опубликованы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук.

Связь работы с государственными программами. Результаты работы получены при выполнении исследований в рамках грантов Российского научного фонда № 21-73-10254 и № 24-73-10191 под руководством П. Г. Рудаковской, а также в рамках проекта, поддержанного Фондом содействия инновациям по программе «УМНИК» № 0092399/ГУ/2023, руководителем которого являлся автор работы.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, экспериментальной части, описывающей материалы и методики синтеза МП, модификации и функционализации их поверхности, и методы их исследования *ex vivo*, *in vitro* и *in vivo*, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 250 страницах машинописного текста, содержит 4 таблицы и 57 рисунков. Список литературы включает 251 источник.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационного исследования, сформулированы цель и задачи работы, отражены научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

В первой главе представлен обзор литературы, посвящённый формированию, стабилизации и свойствам газонаполненных микропузырьков. Рассмотрены механизмы их образования, взаимодействие с ультразвуком и роль белков, полимеров и белково-композитных систем в формировании оболочки микропузырьков.

Во второй главе описаны материалы, оборудование и методы исследования, использованные для получения и изучения белково-композитных систем и микропузырьков.

В третьей главе, состоящей из восьми разделов, представлены результаты диссертационного исследования и их обсуждение. Рассмотрены синтез и физико-химическая характеристика амфифильных сополимеров П(ВП–АК), формирование белково-композитных комплексов БСА и исследование их структуры и свойств. Представлены результаты получения и исследования белково-композитных микропузырьков, анализа процессов их формирования в кавитационном поле, оценки акустических характеристик *in vitro* и *in vivo*, а также исследования биосовместимости разработанных микропузырьков.

3.1 Разработка методологии и платформы комбинированных микропузырьков

В данном разделе описана разработанная универсальная методология синтеза белково-композитных микропузырьков, основанная на комплексообразовании бычьего сывороточного альбумина (66 кДа) с модифицирующими добавками и последующей ультразвуковой обработке. В качестве добавок использовали амфифильные сополимеры N-винил-2-пирролидона с акриловой кислотой (П(ВП-АК)) с молекулярной массой 3,5–18 кДа и концевыми меркаптановыми группами (С8/ОМ или С18/ОДМ), а также низкомолекулярный полиамин — спермин (ПАм, 0,35 кДа). (рис. 1)

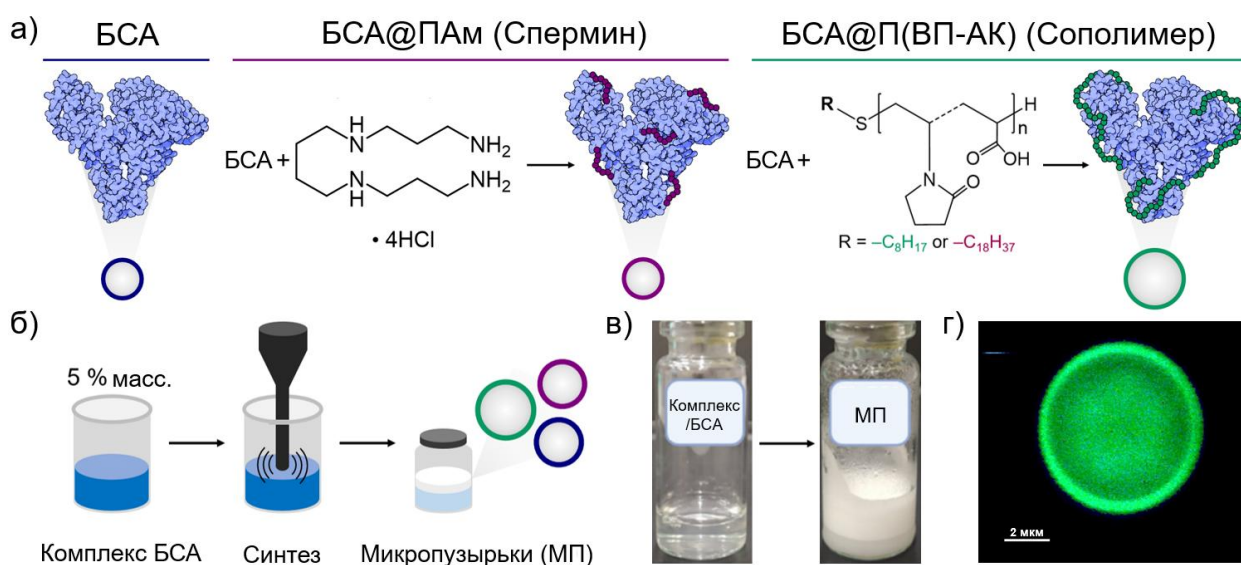


Рисунок 1 – Платформа синтеза МП на основе БСА и комплексов. а) МП были синтезированы из БСА и из комплексов БСА@ПАм (мольное соотношение = 3 : 57) или БСА@П(ВП-АК). б) поэтапная схема синтеза с помощью ультразвука (соникация). в) Фотографии пробирок, иллюстрирующие этапы синтеза. г) Флуоресцентное изображение комбинированного МП

На стадии комплексообразования при 50 °С формировались белково-композитные комплексы, которые далее подвергались соникации (20 кГц, 5 % мас./об.), что приводило к образованию устойчивой пены газонаполненных микропузырьков.

Впервые платформа была реализована на примере сополимера с 10 мол.% акриловой кислоты, С18-концевой группой и массой 18 кДа, затем расширена на библиотеку систем с варьированием молекулярной массы (3,5–15 кДа), гидрофобной концевой группы (С8, С18) и массового соотношения БСА:П(ВП-АК) (50:1–3:1). Получено более 60 формуляций МП, что позволило установить влияние структуры сополимера на выход и характеристики пузырьков. (рис. 2)

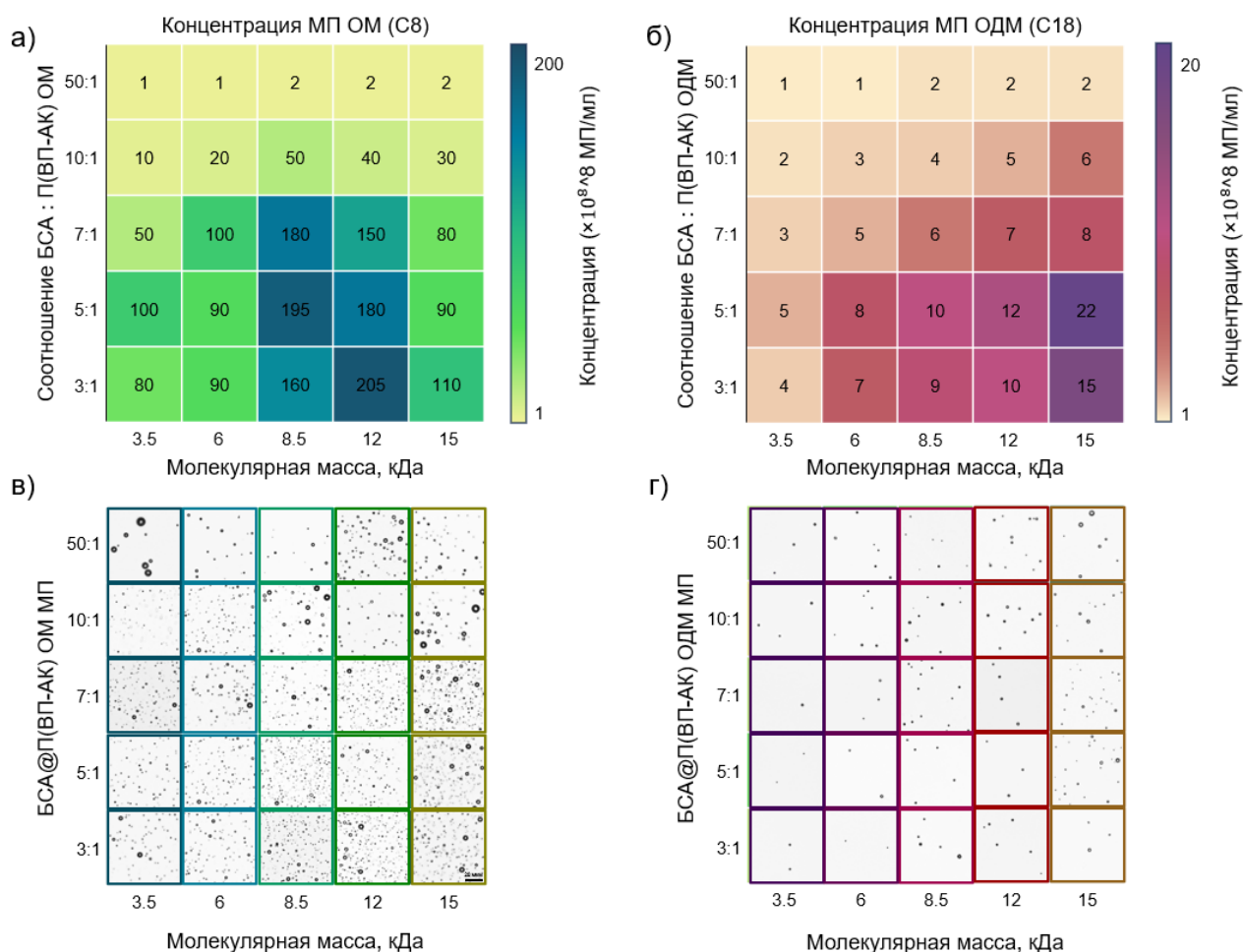


Рисунок 2 – а) Карты концентрации микропузырьков ($\times 10^8$ МП/мл) для серий ОМ и б) ОДМ концевых групп сополимера в зависимости от их молекулярной массы (3,5–15 кДа) и массового соотношения БСА:П(ВП-АК) (50:1; 10:1; 7:1; 5:1; 3:1). в, г) МП, полученные методом оптической микроскопии. Масштаб 20 мкм

Показано, что введение ОМ-сополимеров обеспечивает до 100-кратное увеличение концентрации МП по сравнению с БСА МП при значении среднего диаметра $2,3 \pm 1,2$ мкм. В то же время ОДМ-сополимеры формируют МП с большим значением среднего диаметра $3,7 \pm 1,4$ мкм при существенно меньшем выходе. Для ОМ-сополимеров при $M_n = 8,5\text{--}12$ кДа и соотношениях 5:1–3:1 достигаются максимальные значения до $2,05 \times 10^{10}$ МП/мл (100-кратное превышение относительно БСА МП). Для ОДМ-сополимеров при $M_n = 15$ кДа концентрации не превышают $2,22 \times 10^9$ МП/мл (22-кратное увеличение).

Предложенная методология показала универсальность и применимость как к макромолекулярным модификаторам (П(ВП-АК)), так и к низкомолекулярным полиаминам (ПАм) с улучшенными характеристиками по сравнению с белковыми аналогами, что подтверждает общий принцип платформы (рис. 3).

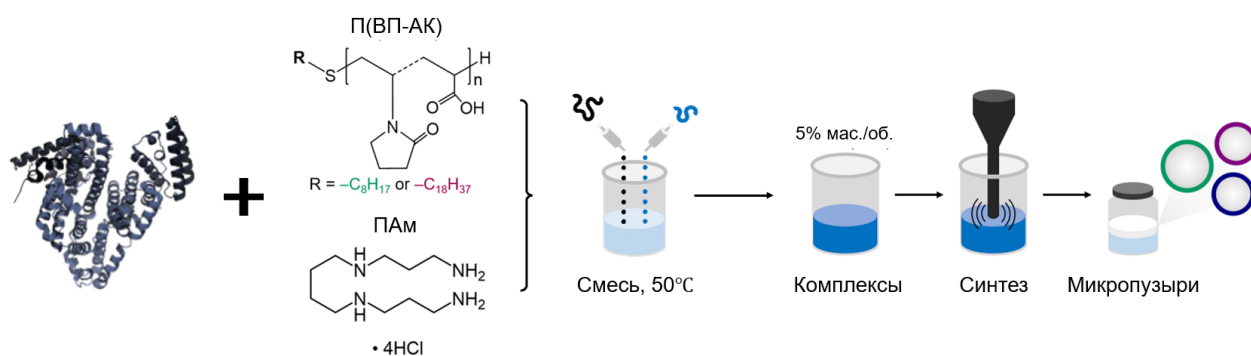


Рисунок 3 – Схема синтеза микропузырьков. БСА (66 кДа) смешивали с амфифильными сополимерами П(ВП-АК) (3,5–15 кДа; $\text{C}_8/\text{ОМ}$ или $\text{C}_{18}/\text{ОДМ}$) либо с полиамином (спермин, 0,35 кДа). При 50 °C формировались белково-композитные комплексы, которые после соникации (20 кГц, 5 % (мас./об.)) превращались в газонаполненные МП (БСА МП, БСА@П(ВП-АК) МП, БСА@ПАм МП)

Таким образом, разработана воспроизводимая методика получения комбинированных микропузырьков, обеспечивающая регулирование их концентрации и размерного профиля за счёт выбора структуры модификатора. Это создаёт основу для дальнейшего анализа механизмов комплексообразования, сохранности белковой структуры и акустических свойств (разд. 3.2–3.8).

3.2 Оптимизация условий комплексообразования БСА@П(ВП-АК)

Варьирование условий получения микропузырьков позволило определить, что оптимальным оказался режим, при котором суммарная массовая доля комплекса составляла 5 %, а растворы белка и сополимера готовили отдельно, прогревали до 50 °C и смешивали при той же температуре с выдержкой 1 час. Такой подход предотвращал локальное перенасыщение и обеспечивал более равномерное распределение сополимера, позволяя воспроизводимо формировать комплексы в диапазоне соотношений БСА:П(ВП-АК) = 15:1–1:15 (рис. 4). Формирование гибридных комплексов БСА@П(ВП-АК) верифицировалось методом ИК-Фурье спектроскопии. Показано, что в ИК-Фурье спектрах комплексов сохраняются характерные полосы как БСА, так и П(ВП-АК), что свидетельствует о присутствии обоих компонентов в составе комплекса при отсутствии признаков образования новых ковалентных связей. Полученные данные согласуются с моделью нековалентного взаимодействия альбумина и сополимера, реализуемого за счёт ионных и гидрофобных контактов. При изменении массового соотношения БСА:П(ВП-АК) спектр плавно трансформируется от белкового к полимерному типу, при этом сохраняются полосы обоих компонентов, а их соотношение определяется составом.

Полученные данные подтверждают, что белково-полимерные комплексы формируются в растворе до стадии соникации и далее участвуют в стабилизации микропузырьков, обеспечивая комбинированную природу их оболочки.

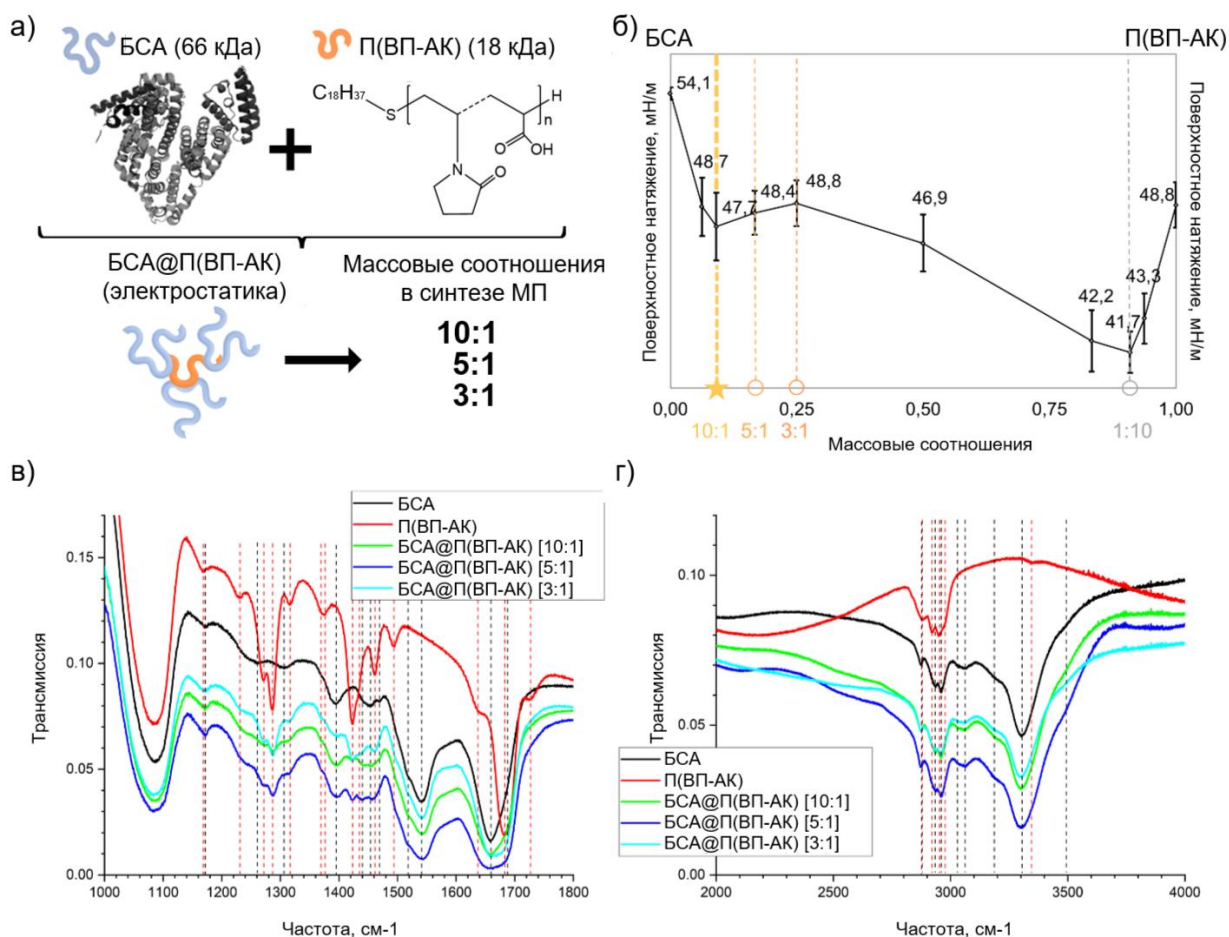


Рисунок 4 – а) Схема образования электростатического комплекса БСА@П(ВП-АК). б) тензиометрические данные для комплексов с различными массовыми соотношениями БСА:П(ВП-АК). в, г) ИК-спектры с преобразованием Фурье чистых БСА (чёрный) и П(ВП-АК) (красный) и их комплексов при соотношениях 10:1 (зелёный), 5:1 (синий) и 3:1 (бирюзовый)

3.3 Структурные параметры сополимеров П(ВП-АК) и их влияние на формирование микропузырьков

Для выявления факторов, определяющих эффективность формирования белково-композитных микропузырьков, была получена библиотека сополимеров П(ВП-АК) с различной молекулярной массой (3,5–15 кДа) и гидрофобными концевыми группами: *n*-октилмеркаптан и *n*-октадецилмеркаптан. Это позволило оценить влияние молекулярной массы и концевых групп на самоорганизацию макромолекул и стабилизацию межфазной границы. Синтезированные серии использовали для построения обобщённой карты свойств и анализа эффективности формирования микропузырьков в комплексе с БСА. ОМ- и ОДМ-сополимеры существенно различаются по критической концентрации агрегации (ККА) и характеру самоорганизации (рис. 5). Для ОМ ККА составляет 0,3–0,8 мг/мл и возрастает с увеличением молекулярной массы (3,5–15 кДа), тогда как для ОДМ она ниже — 0,05–0,2 мг/мл, что отражает их склонность к образованию мицелл. Данные ДСР подтверждают это: ОМ формируют агрегаты 30–80 нм, ОДМ — 200–400 нм. Также было показано, что ОМ-сополимеры снижают поверхностное натяжение до 42–45 мН/м (БСА 52–54

мН/м), тогда как для ОДМ σ составляет 48–50 мН/м, что указывает на более высокую межфазную активность ОМ.

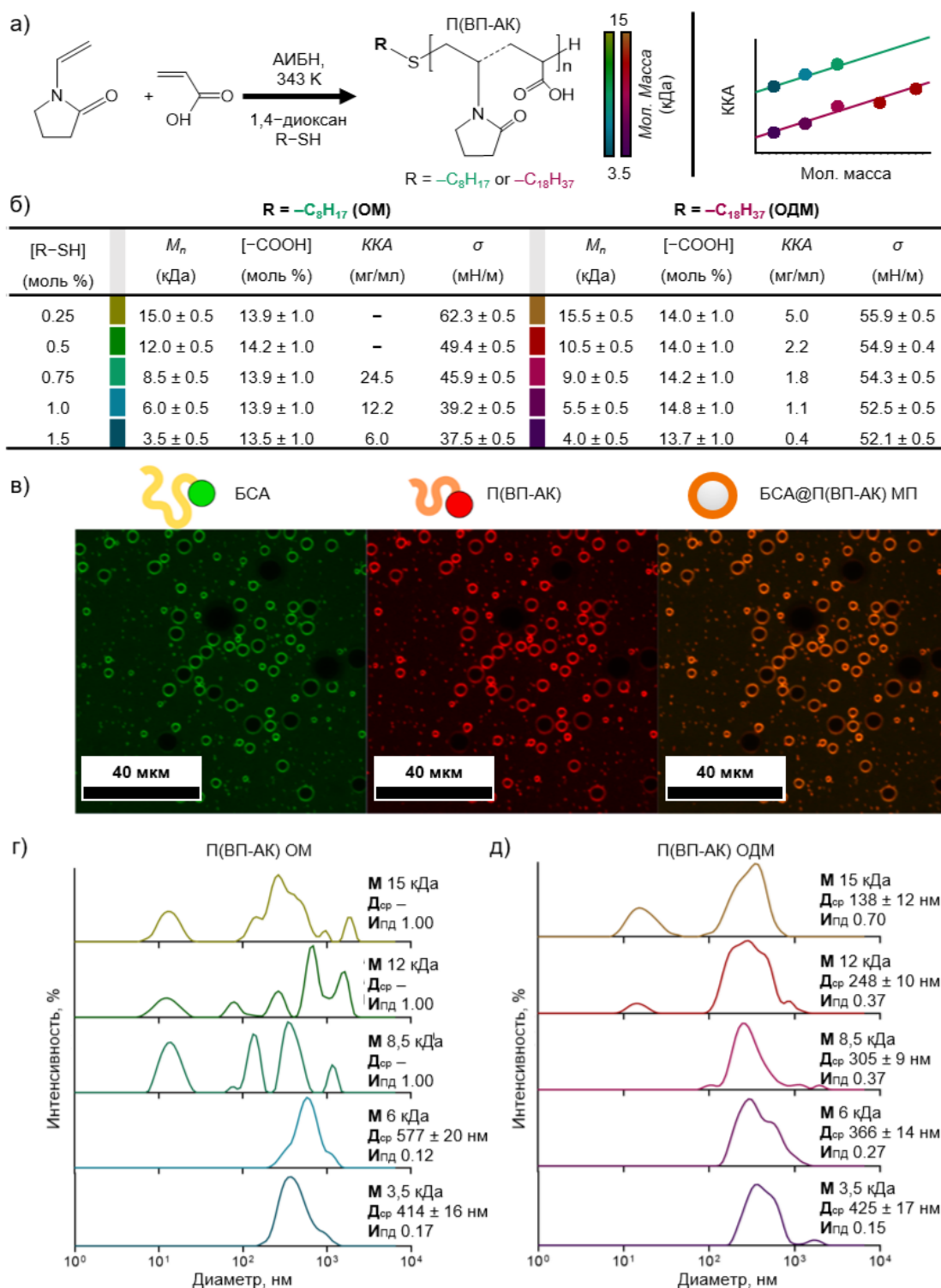


Рисунок 5 – Структурные и коллоидные характеристики сополимеров П(ВП-АК). а) Схема синтеза и зависимость ККА от числовой средней M_n и типа концевой группы: зелёная – ОМ, красная – ОДМ; б) основные параметры сополимеров: M_n , содержание акриловых звеньев, ККА и поверхностное натяжение σ при 12,5 мг/мл в зависимости от доли ОМ или ОДМ; в) конфокальная микроскопия меченых БСА и П(ВП-АК); г, д) показатели мицеллоподобной самоорганизации: средний гидродинамический диаметр и индекс полидисперсности при 20 мг/мл для серий сополимеров с ОМ и ОДМ

Данные свойства сополимера с ОМ концевой группой способствуют межфазным процессам и высокому выходу МП, тогда как сополимер с ОДМ концевой группой усиливает объёмную агрегацию и ограничивает эффективность генерации пузырьков.

3.4 ИК-спектроскопическое исследование комплексов и микропузырьков, влияние массового соотношения.

Структурная целостность БСА в составе комплексов БСА@П(ВП-АК) и соответствующих микропузырьков оценивалась методом ИК-Фурье спектроскопии с использованием приставки НПВО. Анализ проводился для систем на основе П(ВП-АК) ОМ (8,5 кДа) при соотношениях БСА:П(ВП-АК) 10:1–3:1 (рис. 6). В спектрах всех исследованных образцов регистрируются характерные полосы амид I (1650 см^{-1}), чувствительная к вторичной структуре белка, и амид II (1540 см^{-1}), отражающая состояние пептидных связей. Сравнение спектров комплексов и соответствующих микропузырьков показывает, что формирование микропузырьков не сопровождается существенными изменениями положения и формы полосы амид I. Для нативного БСА и БСА МП без сополимера интенсивность полосы амид II превышает интенсивность амид I. При увеличении содержания сополимера отношение амид II/амид I последовательно уменьшается, а именно при массовом соотношении 5:1 наблюдается выравнивание интенсивностей полос, тогда как при 3:1 полоса амид II становится менее интенсивной по сравнению с амид I. Наблюдаемая тенденция свидетельствует об изменении характера взаимодействий в системе «белок–сополимер». При умеренном содержании сополимера формируются наиболее стабильные белково-полимерные комплексы, тогда как при его избытке взаимодействие между компонентами ослабевает, вероятно, вследствие электростатического отталкивания и затруднения доступа полимерных цепей к поверхности белка. При этом отсутствие заметных изменений полосы амид I указывает на сохранение преимущественно α -спиральной структуры БСА после ультразвуковой обработки и формирования межфазной оболочки. Важно отметить, что аналогичные изменения соотношения амид II/амид I наблюдаются как для комплексов, так и для соответствующих микропузырьков. Это подтверждает, что оболочка микропузырьков формируется из предварительно образованных белково-полимерных комплексов и сохраняет их основные структурные особенности после перехода в межфазное состояние. Таким образом, анализ ИК-Фурье спектров показал, что массовые соотношения БСА:П(ВП-АК) 5:1–7:1 являются наиболее благоприятными для формирования структурно стабильных комплексов и оболочек микропузырьков. При данных составах сохраняется вторичная структура альбумина и реализуется оптимальный баланс межмолекулярных взаимодействий, тогда как при соотношении 3:1 наблюдаются признаки их ослабления и изменение характеристик микропузырьков.

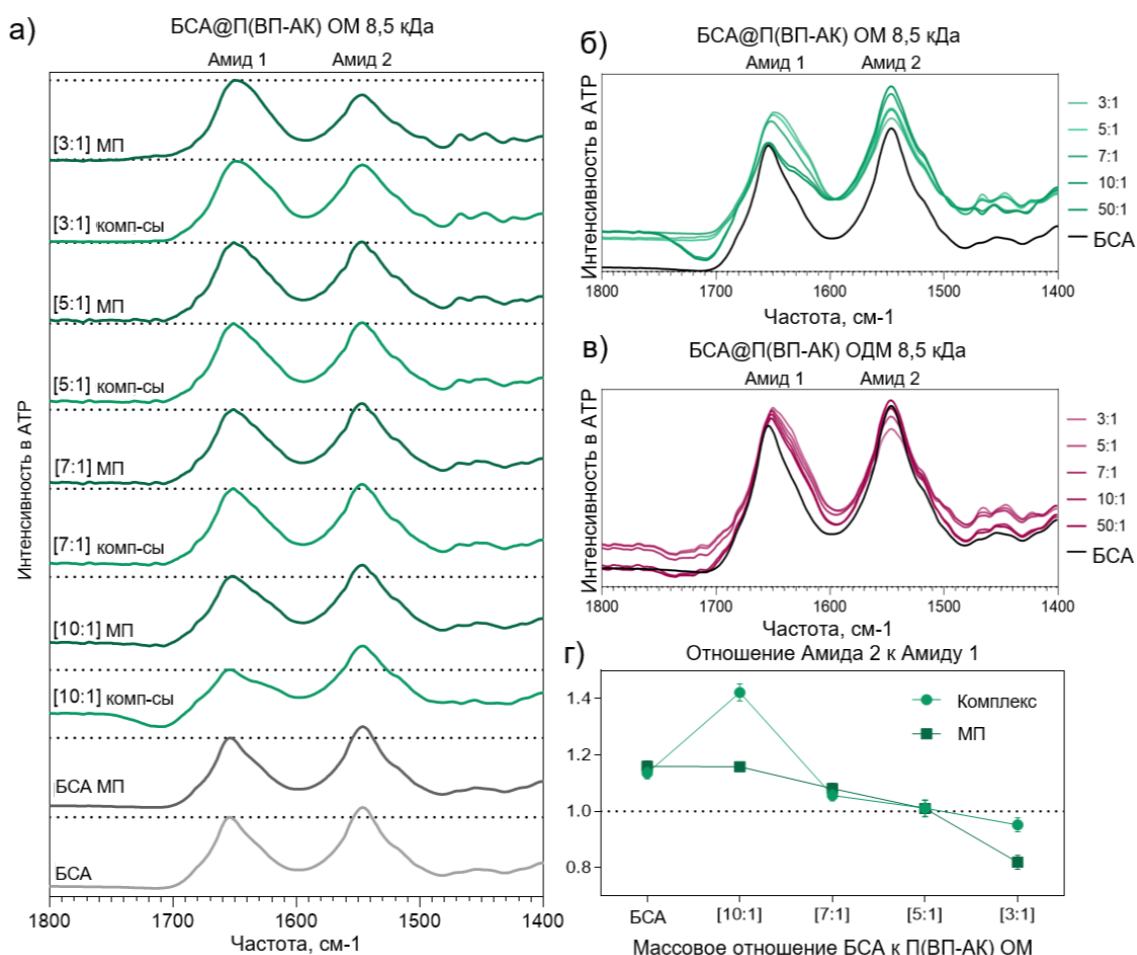


Рисунок 6 – а) ИК-Фурье спектры водных растворов БСА, соответствующих микропузырьков, комплексов БСА@П(ВП-АК) (ОМ, 8,5 кДа) при массовых соотношениях 10:1, 7:1, 5:1 и 3:1, а также микропузырьков с оболочками из данных комплексов; пунктиром отмечены полосы амид I; б, в) Характерные спектры амидных полос комплексов БСА@П(ВП-АК), полученных с ОМ- и ОДМ-концевыми группами при различных массовых соотношениях; г) соотношения интенсивностей амид II/амид I для комплексов и соответствующих микропузырьков

3.5 Сохранность вторичной структуры БСА в оболочке микропузырьков

Структурная целостность БСА в составе комплексов и оболочек МП оценивалась методами ИК-Фурье спектроскопии и спектроскопии кругового дихроизма (КД). Во всех образцах регистрируются полосы амид I (1650 см^{-1}) и амид II (1545 см^{-1}) (рис. 7а). Изменение их относительных интенсивностей в комплексах с ПАМ и П(ВП-АК) отражает перераспределение взаимодействий в системе «белок–стабилизатор». При переходе от растворов комплексов к микропузырькам форма и положение полосы амид I сохраняются, что свидетельствует о сохранности α -спиральной структуры БСА в составе оболочки. При этом отношение амид II/амид I последовательно уменьшается в ряду: нативный БСА $\rightarrow$ соникатированный БСА $\rightarrow$ БСА МП $\rightarrow$ БСА@ПАМ и БСА@П(ВП-АК), что указывает на ослабление межбелковых контактов и формирование более упорядоченных белок-полимерных комплексов без образования β -агрегатов.

Спектры КД дальнего ультрафиолетового диапазона (185–230 нм) нативного БСА характеризуются минимумами при 208 и 222 нм, соответствующими α -спиральной структуре. После ультразвуковой обработки наблюдается их частичное сглаживание, что свидетельствует о частичной денатурации белка. Показано, что после отмывки образцов МП их спектры КД схожи со спектром нативного БСА. Анализ факторов диссимметрии показывает, что в оболочке преимущественно сохраняются молекулы с α -спиральной организацией (рис. 7в).

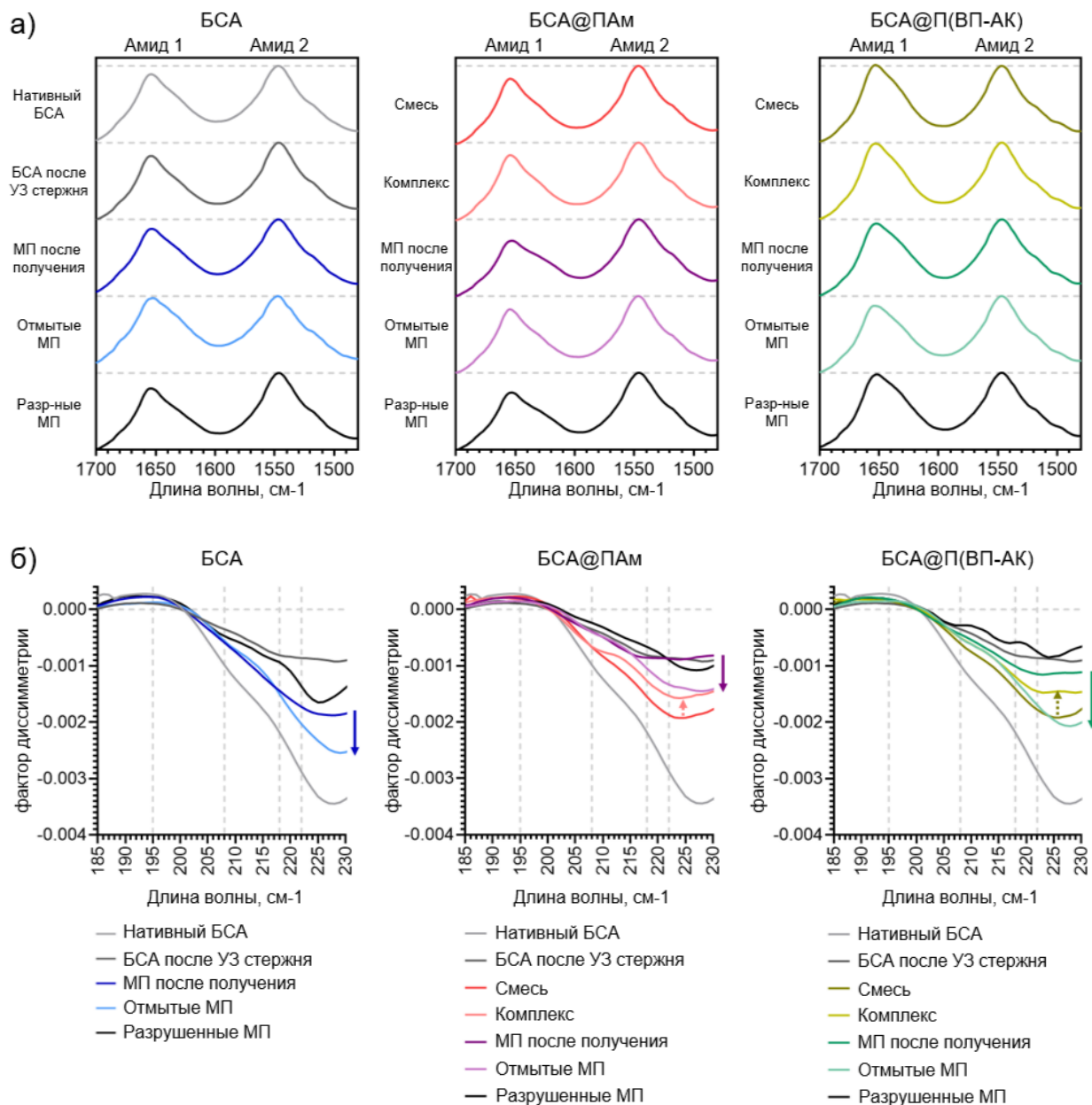


Рисунок 7 – а) ИК-Фурье спектры для всех указанных образцов с обозначенными полосами амид I и амид II; пунктиром показаны уровни интенсивности амид II. б) Зависимость фактора диссимметрии по данным кругового дихроизма (185–230 нм) для БСА и БСА МП; БСА в присутствии ПАм и БСА@ПАм МП; БСА в присутствии П(ВП-АК) и БСА@П(ВП-АК) МП. Жирные стрелки отражают изменения при переходе от исходной к отмывой суспензии МП, штриховые — при переходе от БСА к его комплексам с добавками

Таким образом, совокупность данных спектроскопии КД и ИК-Фурье спектроскопии свидетельствует о том, что ультразвуковое формирование микропузырьков не сопровождается существенной денатурацией альбумина. Оболочка образуется преимущественно из нативоподобных молекул БСА, тогда как частично денатурированные фракции удаляются при отмывке, обеспечивая стабильность и биосовместимость белково-композитных микропузырьков.

3.6 Формирование, физико-химические и морфологические параметры микропузырьков

Комплексообразование БСА с макро- и низкомолекулярными добавками способствует формированию устойчивых газонаполненных структур малого размера, что определяет параметры получаемых МП. Полученные МП различались по концентрации, размеру и поверхностному заряду в зависимости от состава оболочки (рис. 8). Наибольшая концентрация наблюдалась для БСА@ПАм МП и БСА@П(ВП-АК) МП и достигала порядка 10^{10} МП/мл, что статистически значимо превышало значения для БСА МП. При этом БСА@П(ВП-АК) МП характеризовались увеличенным средним диаметром (2–2,5 мкм), тогда как БСА МП и БСА@ПАм МП сохраняли размеры около 1 мкм. Согласно данным ζ -потенциала, все исследуемые системы обладали отрицательным поверхностным зарядом, однако для БСА@П(ВП-АК) МП наблюдалось наиболее выраженное снижение ζ -потенциала, что может быть связано с присутствием карбоксильных групп сополимера на межфазной поверхности. Оптическая и электронная микроскопия подтверждают формирование сферических микропузырьков с выраженной оболочкой. Для БСА@П(ВП-АК) МП характерно образование более крупных структур, что согласуется с данными распределения размеров.

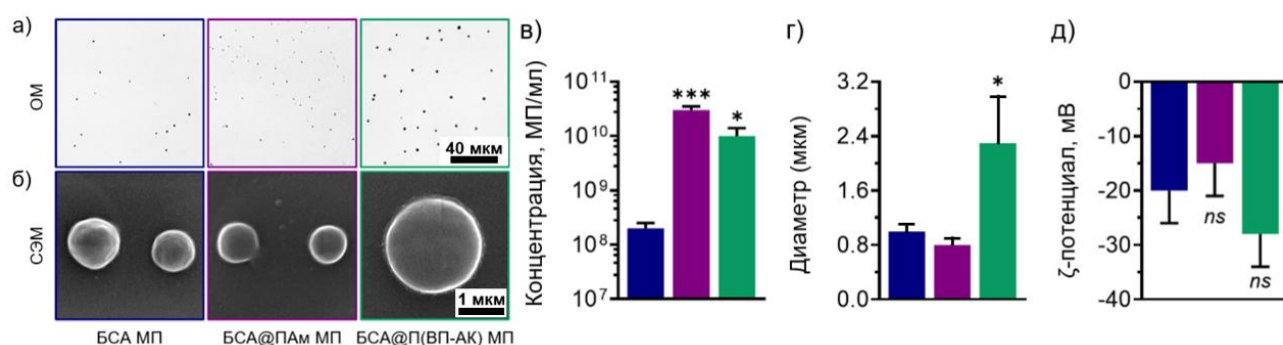


Рисунок 8 – Физико-химическая, морфологическая и акустическая характеристика микропузырьков. а) Оптические микрофотографии (ОМ) образцов; б) Изображения, полученные методом электронной микроскопии (СЭМ); в) Концентрации МП/мл; г) средние диаметры; д) ζ -потенциал

3.7 Биосовместимость и системная безопасность микропузырьков

Исследование на лабораторных животных *in vivo* показало, что введение МП не вызывало статистически значимых изменений гематологических и биохимических показателей, значения оставались в пределах нормы, что свидетельствует об отсутствии токсических эффектов и воспалительной

реакции. Наибольшее накопление МП и их составляющих наблюдалось в печени и селезёнке, умеренное — в лёгких, минимальное — в почках и сердце. Профиль соответствует клиренсу через ретикулоэндотелиальную систему и согласуется с данными для липидных контрастных агентов (рис. 9 а-г, е).

Исследование на крови человека *ex vivo* по данным лазерного этасканирования показало, что деформируемость эритроцитов после введения МП при низком и высоком сдвиговом напряжении (3 и 20 Па) не изменялась (рис. 9 д,ж).

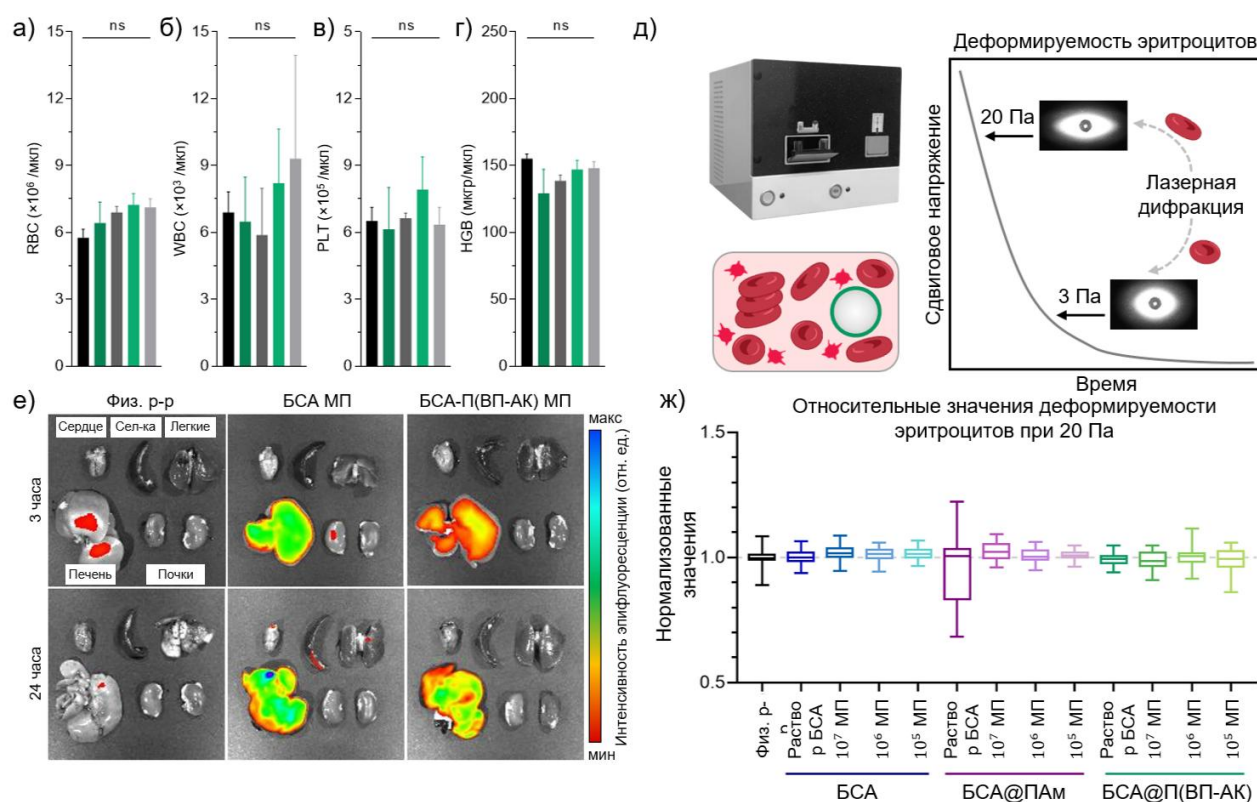


Рисунок 9 – Биосовместимость и системная безопасность микропузырьков. а–г) Гематологические параметры — эритроциты (RBC), лейкоциты (WBC), тромбоциты (PLT) и гемоглобин (HGB), измеренные в различные моменты времени после введения БСА МП и БСА@П(ВП-АК) МП (ОМ, 8,5 кДа, 5:1) по сравнению с контролем (физиологический раствор, 24 ч). (д) Репрезентативные изображения извлечённых органов с наложением сигнала флуоресценции. (е) Схема RheoScan и принцип измерения. (ж) Относительная деформируемость эритроцитов при высоком сдвиговом напряжении (20 Па)

3.8 Эхоконтрастные свойства микропузырьков *in vitro* и *in vivo*

Использование комплексов альбумина с сополимером в качестве оболочки микропузырьков увеличивает интенсивность акустического сигнала в нелинейном контрастном режиме (НКР) в 4-6 раз и позволяет увеличивать время наблюдения сигнала в 5 раз (с 2 до 10 минут) по сравнению с коммерческим препаратом Оптисон в модельной системе кровеносного русла человека.

Эхоконтрастные характеристики МП исследованы при эхокардиографии у крыс в В-режиме и НКР режиме. БСА МП были исключены из эксперимента ввиду их минимальной продолжительности существования *in vitro* (<90 с) и

низкой эхогенности *in vivo* (данные литературы). В качестве контроля использовали физиологический раствор. БСА@ПАм МП и БСА@П(ВП-АК) МП, введённые в сопоставимых концентрациях (10^9 МП/мл), обеспечивали формирование внутрисердечного контраста (рис. 10). Физиологический раствор не вызывал заметного усиления эхосигнала. БСА@ПАм МП демонстрировали 2,1-кратное усиление сигнала по сравнению с контролем через 1 мин после введения, однако через 5 мин различие снижалось до 1,3 раза. БСА@П(ВП-АК) МП формировали более выраженный контраст: интенсивность НКР сигнала превышала уровень физиологического раствора в 5,2 раза на 1-й минуте и в 2,1 раза на 5-й минуте наблюдения. Продолжительность эхогенности составляла более 5 мин.

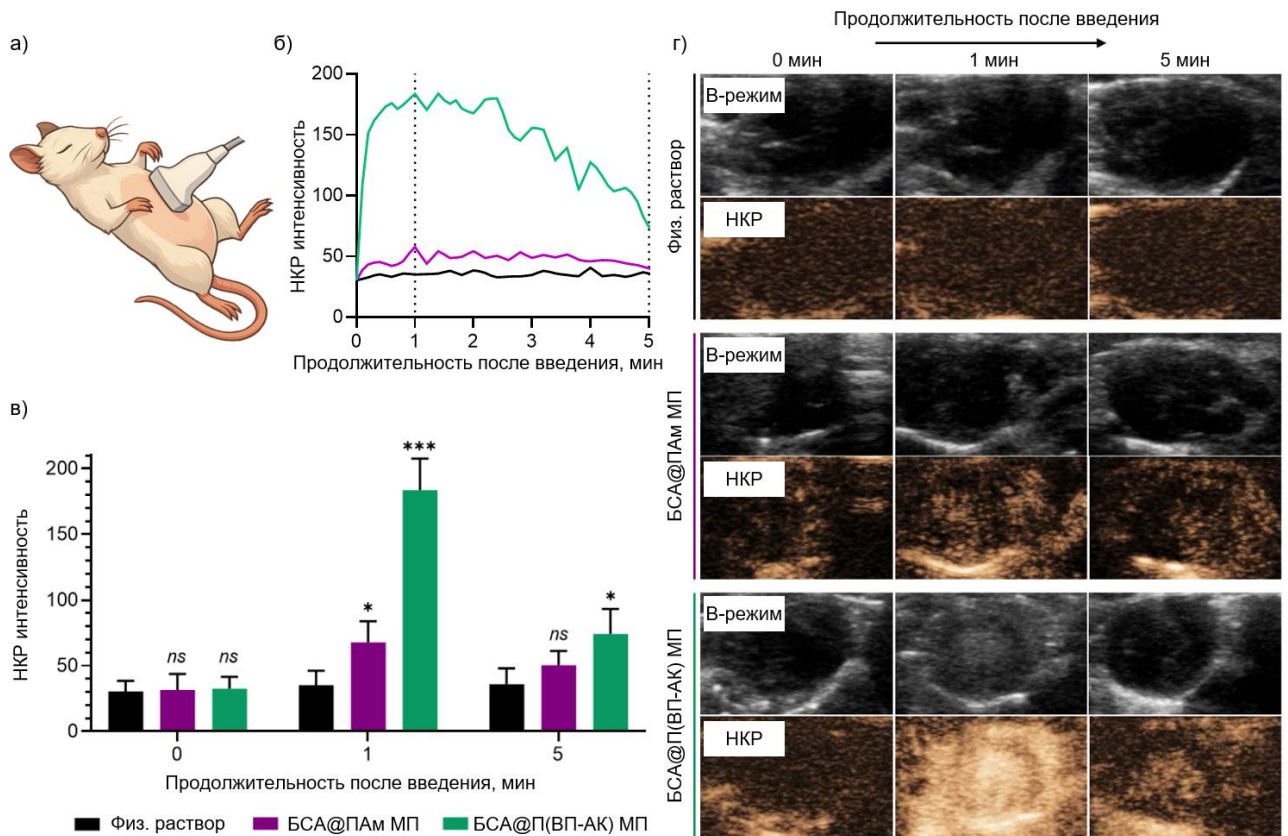


Рисунок 10 – Эхоконтрастные свойства микропузырьков *in vivo* (эхокардиография у крыс). а) Схематическое изображение экспериментального образца. б) Динамика интенсивности НКР-сигнала во времени для каждой системы. в) Средние значения НКР-интенсивности на 0, 2 и 5 мин после введения. г) Типичные ультразвуковые изображения сердца крысы через 0, 1 и 5 минут после инъекции физиологического раствора, БСА@ПАм МП и БСА@П(ВП-АК) МП

Таким образом, гибридные БСА@П(ВП-АК) МП обеспечивают наиболее высокий уровень и длительность контрастного эффекта *in vivo*, что подтверждает их перспективность в качестве ультразвуковых контрастных агентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполненного исследования были разработаны белково-композитные микропузырьки на основе комплексов альбумина с амфифильным сополимером N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты, а также со спермином, и установлены физико-химические закономерности их формирования, структуры и функциональных свойств. Показано влияние состава, молекулярной массы и строения стабилизаторов на процессы комплексообразования, межфазную активность, эффективность образования, размеры, устойчивость и структуру микропузырьков. Установлено, что разработанные микропузырьки сохраняют нативоподобную структуру белка, характеризуются высокой гемо- и биосовместимостью, обладают повышенной стабильностью и обеспечивают существенное улучшение акустических характеристик по сравнению с существующим белковым ультразвуковым контрастным препаратом (Оптисон).

На основании полученных экспериментальных данных были сделаны следующие выводы:

1. Установлено, что введение амфифильного сополимера N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты в состав белково-композитных систем приводит к существенному повышению эффективности образования микропузырьков на основе альбумина. Для модельной системы с октадецилмеркаптановой концевой группой зависимость поверхностного натяжения от состава носит немонотонный характер: локальный минимум наблюдается при массовом соотношении альбумин : сополимер 10:1 (47–48 мН/м), глобальный минимум — при 1:10 (42–43 мН/м). В диапазоне 10:1–3:1 формируются устойчивые дисперсии со средним диаметром микропузырьков $3,7 \pm 1,4$ мкм и концентрацией до $2,2 \times 10^9$ МП/мл.
2. Показано, что молекулярная масса сополимера (3,5–15 кДа) и природа гидрофобной концевой группы определяют самоорганизацию макромолекул, межфазную активность и параметры получаемых микропузырьков. Для сополимеров с октильной концевой группой концентрация микропузырьков достигает $1,95\text{--}2,05 \times 10^{10}$ МП/мл в диапазоне оптимальных составов, что до 100 раз превышает значения для микропузырьков из чистого альбумина. Для сополимеров с октадецилмеркаптановой группой концентрация составляет $1,5\text{--}2,2 \times 10^9$ МП/мл.
3. Показано, что свойства предварительно образованных комплексов альбумина с модификаторами определяют размеры, распределение по размерам, акустические свойства и устойчивость формирующихся микропузырьков. При уменьшении массового соотношения альбумин: сополимер происходит переход от компактных комплексов размером 5–10 нм к агрегированным структурам более 100 нм, что сопровождается изменением выхода микропузырьков. Для систем БСА@П(ВП-АК) и БСА@ПАм формируются МП со средним диаметром $2,3 \pm 1,2$ и $0,8 \pm 0,2$ мкм соответственно, характеризующиеся узким распределением по

размерам и повышенной коллоидной стабильностью по сравнению с микропузырьками из чистого альбумина. В модели сосуда полученные МП обеспечивают более высокую интенсивность ультразвукового контрастирования по сравнению с чисто белковыми МП.

4. Показано, что ультразвуковое формирование микропузырьков не сопровождается глубокой денатурацией альбумина. Методами спектроскопии КД и ИК-Фурье установлено, что комплексообразование альбумина с амфифильным сополимером N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты, а также со спермином сопровождается частичной конформационной перестройкой белка, не превышающей 30%, тогда как в составе межфазной оболочки микропузырьков степень нарушения конформации не превышает 15%, при сохранении нативоподобных элементов вторичной структуры. Для систем БСА@П(ВП-АК) положение полосы Амид I сохраняется в диапазоне 1655–1650 см^{-1} , а отношение Амид II/Амид I составляет 1,00–1,12, что соответствует значениям для нативного БСА. По данным спектроскопии КД после отмывки микропузырьков наблюдается увеличение амплитуды, свидетельствующее о преимущественном включении в оболочку более структурно сохраненных белковых фракций.
5. Установлено, что комплексообразование альбумина с макро- и низкомолекулярными добавками изменяет распределение и устойчивость газонаполненных прекурсоров микропузырьков. Для БСА преобладают крупные предшественники, а доля фракций менее 20 мкм незначительна. В системах БСА@ПАм и БСА@П(ВП-АК) устойчивые прекурсоры формируются преимущественно в диапазонах 0–20 и 10–20 мкм соответственно; для БСА@П(ВП-АК) их размер не превышает 50 мкм. Это обеспечивает получение концентрированных, монодисперсных и коллоидно стабильных микропузырьков.
6. Показано, что разработанные микропузырьки характеризуются высокой гемо- и биосовместимостью. Методом лазерного эктаскирования *ex vivo* установлено, что МП БСА@П(ВП-АК) в концентрациях 10^5 – 10^7 МП/мл не вызывают статистически значимых изменений агрегации и деформируемости эритроцитов при сдвиговых напряжениях 3 и 20 Па, а критическое напряжение сдвига сохраняется на уровне контроля (200 мПа). После внутривенного введения крысам *in vivo* не выявлено выраженных изменений гематологических показателей, патологического накопления микропузырьков или изменения массы органов; установлено их преимущественное выведение через печень. При этом МП БСА@П(ВП-АК) обеспечивают 5-кратное увеличение интенсивности акустического сигнала в нелинейном контрастном режиме на 1-й минуте по сравнению с Оптисоном и сохраняют 2-кратное преимущество спустя 5 минут после введения по сравнению с микропузырьками на основе комплексов альбумина и спермина в условиях эхокардиографии *in vivo*.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук

1. **Estifeeva T.M.**, Barmin R.A., Rudakovskaya P.G., Nechaeva A.M., Luss A.L., Mezhuiev Ya.O., Chernyshev V.S., Krivoborodov E.G., Klimenko O.A., Sindeeva O.A., Demina P.A., Petrov K.S., Chuprov-Netochin R.N., Fedotkina E.P., Korotchenko O.E., Sencha E.A., Sencha A.N., Shtilman M.I., Gorin D.A. Hybrid (Bovine Serum Albumin)/Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone-co-acrylic acid) Shelled Microbubbles as Advanced Ultrasound Contrast Agents // ACS Applied Bio Materials. – 2022. – vol. 5, № 7. – pp. 3338–3348 (объем 1,56 п.л., авторский вклад 40%). Импакт-фактор 5,05 (JIF); EDN: BRCWAH.
2. Merdalimova A., Barmin R.A., Vorobev V., Aleksandrov A., Terentyeva D., **Estifeeva T.M.**, Chernyshev V.S., German S., Maslov O., Skibina Yu., Rudakovskaya P.G., Gorin D.A. Two-in-One Sensor of Refractive Index and Raman Scattering Using Hollow-Core Microstructured Optical Waveguides for Colloid Characterization // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2024. – vol. 234. – art. 113705 (объем 1,6 п.л., авторский вклад 10%) Импакт-фактор 5,6 (JIF); EDN: NZEDZV.
3. **Estifeeva T.M.**, Nechaeva A.M., Le-Deygen I.M., Adelyanov A.M., Grigoryan I.V., Petrovskii V.S., Potemkin I.I., Abramov A.A., Prosvirnin A.V., Sencha E.A., Borozdenko D.A., Barmin R.A., Mezhuiev Ya.O., Gorin D.A., Rudakovskaya P.G. Ultrasound Protein–Copolymer Microbubble Library Engineering through Poly(vinylpyrrolidone-co-acrylic acid) Structure // Biomaterials Advances. – 2025. – vol. 166. – art. 214074 (объем 2,6 п.л., авторский вклад 42%) Импакт-фактор 5,5 (JIF); EDN: PIQWVQ.
4. **Estifeeva T.M.**, Borozdenko D.A., Papugaeva A.V., Kalinichenko G.L., Vlasova I.P., Gudzerov L.I., Aliev T., Krotkov N.A., Boltenko A.V., Orlova A.O., Nechaeva A.M., Mezhuiev Ya.O., Le-Deygen I.M., Bunin D.A., Petrovskii V.S., Khomutov G.B., Maksimov M.K., Lugovtsov A.E., Priezzhev A.V., Potemkin I.I., Gorin D.A., Gorbunova Yu.G., Skorb E.V., Ulasevich S.A., Barmin R.A., Rudakovskaya P.G. Direct Insights into Synthesis, Protein Integrity, and Blood Microrheology of Albumin Microbubbles // Acta Biomaterialia. – 2025. – vol. 206. – pp. 267–282. (объем 2,7 п.л., авторский вклад 45%) Импакт-фактор 9,6 (JIF); EDN: QXXBTN.
5. **Estifeeva T.M.**, Kalinichenko G., Morokov E., Fedotkina E.P., Sencha A.N., Barmin R.A., Rudakovskaya P.G. Low-Cost Gynecologic Ultrasound Phantom with Tissue-Mimicking Properties for Hysterosalpingo Contrast Sonography // Medical Physics. – 2025. – vol. 52, № 11. – art. e70097 (объем 1,4 п.л., авторский вклад 40%) Импакт-фактор 3,2 (JIF); EDN: GZGOVN.

Список сокращений

БСА – Бычий сывороточный альбумин,
 МП – Микропузырьки,
 НПВО - Нарушенное полное внутреннее отражение,
 П(ВП-АК) – Сополимер N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты,
 ПАм – Полиамин (спермин),
 ОМ – Октилмеркаптановая концевая группа,
 ОДМ – Октадецилмеркаптановая концевая группа,
 ККА – Критическая концентрация агрегации,
 КД – Круговой дихроизм,
 НКР – Нелинейный контрастный режим ультразвуковой визуализации

Список литературы

1. Barmin R. A., Moosavifar M., Herrmann A., Kiessling F., Lammers T., Pallares R. M. Multifunctional Ultrasound Microbubbles // *Chemical Reviews*. 2026. Vol. 126, № 3. P. 1949–2005. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5c00280.
2. Moosavifar M., Barmin R. A., Rama E. [et al.]. Polymeric Microbubble Shell Engineering: Microporosity as a Key Factor to Enhance Ultrasound Imaging and Drug Delivery Performance // *Advanced Science*. 2024. Vol. 11, № 40. Art. e2404385. DOI: 10.1002/advs.202404385.
3. He J., Shi H., Shi L., Fan R., Zhu Z., Li Z., Liu J. Influence of protein nativity on the stability of bovine serum albumin coated microbubbles // *iScience*. 2024. Vol. 27, № 3. Art. 109286. DOI: 10.1016/j.isci.2024.109286.
4. Bouakaz A., de Saint Victor M., Coussios C. C. [et al.]. From concept to early clinical trials: 30 years of microbubble-based ultrasound-mediated drug delivery research // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2024. Vol. 206. Art. 115199. DOI: 10.1016/j.addr.2024.115199.
5. Hernandez C., Paris J. L., Vallet-Regí M. Ultrasound-responsive microbubbles and nanodroplets: a pathway to targeted drug delivery // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2024. Vol. 205. Art. 115178. DOI: 10.1016/j.addr.2023.115178.
6. Hlushko R., Ghosh R., Rao A., Miller D. S., de Pablo J. J., Tirrell M. V., Marras A. E. Protein–polyelectrolyte complexation: effects of sterically repulsive groups, macromolecular architecture and hierarchical assembly // *Soft Matter*. 2025. Vol. 21. P. 418–426. DOI: 10.1039/D4SM01254B.