

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

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научные руководители:
д.х.н., профессор Горин Д.А.,
к.х.н., Рудаковская П.Г.

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	9
ВВЕДЕНИЕ.....	11
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	21
1.1. Ультразвук как физико-химический фактор воздействия на межфазные системы.....	21
1.1.1. Физические принципы распространения ультразвуковых волн в конденсированных средах.....	21
1.1.2. Взаимодействие ультразвука с гетерогенными и коллоидными системами, нелинейные эффекты в биологических и модельных средах	24
1.1.3. Ограничения стандартной ультразвуковой визуализации как отражение физико-химических свойств тканей.....	25
1.2. Контрастные агенты для ультразвуковой диагностики.	
Газонаполненные микропузырьки как физико-химические межфазные системы.....	26
1.2.1 Контрастные агенты как искусственно вводимые акустически активные межфазные структуры	26
1.2.2. Термодинамическая неустойчивость газовых пузырьков в жидкостях, поверхностное натяжение, давление Лапласа и диффузия газа	31
1.2.3. Межфазная оболочка как фактор стабилизации газовой фазы	33
1.2.4. Акустический отклик микропузырьков и его связь с реологическими параметрами оболочки	40
1.2.5. Основные модели динамики микропузырьков	42
1.3. Методы получения микропузырьков	44

1.3.1. Ультразвуковой метод получения микропузырьков	44
1.3.2. Микрофлюидные методы получения микропузырьков	46
1.3.3. Электрогидродинамические и мембранные методы формирования микропузырьков	48
1.4. Белковые микропузырьки и белковые межфазные структуры	49
1.4.1. Поверхностная активность белков и их структурная организация на границе газ–жидкость как природные поверхностно-активные макромолекулы.....	50
1.4.2. Перестройка вторичной структуры белка и её роль в свойствах оболочки.....	52
1.4.3. Влияние условий среды на устойчивость белковых микропузырьков и подходы к её повышению.....	54
1.4.4. Биосовместимость, иммунное распознавание и белковая корона белковых микропузырьков.....	57
1.5 Амфифильные полимеры: самоорганизация, архитектура и межфазные свойства	59
1.5.1. Амфифильные полимеры и их межфазная активность.....	59
1.5.3. Гидрофильные полимеры в амфифильных системах: полиэтиленгликоль и его альтернативы	64
1.6. Белково-полимерные комплексы как межфазные системы: формирование, структура и функциональные свойства	69
1.6.1. Формирование и структурная организация белково-полимерных комплексов: роль молекулярных параметров и условий среды.....	70
1.6.2. Белково-полимерные комплексы на межфазных границах: межфазная активность, стабильность и ограничения	73
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	79

2.1. Материалы	79
2.2 Оборудование	80
2.3 Методы	81
2.3.1 Синтез и характеристика сополимеров П(ВП-АК)	81
2.3.2 Определение среднечисловой молекулярной массы методом титрования	82
2.3.3. Структурная и коллоидная характеристика сополимеров П(ВП– АК)	83
2.3.4 Определение содержания звеньев акриловой кислоты в сополимерах П(ВП–АК)	84
2.3.5. Получение флуоресцентно-меченных производных БСА.....	85
2.3.6. Получение флуоресцентно-меченных производных П(ВП–АК)...	86
2.3.7 Получение комплексов БСА@П(ВП-АК)	87
2.3.8. Получение комплексов БСА@ПАм	88
2.3.9. Динамическое светорассеяние белка и белково-композитных комплексов	88
2.3.10. Измерение поверхностного натяжения.....	89
2.3.11. ИК-Фурье спектроскопия комплексов БСА@П(ВП–АК) в режиме пропускания	90
2.3.12. Атомно-силовая микроскопия	91
2.3.13. Протокол молекулярного моделирования взаимодействий БСА@П(ВП–АК) в составе комплекса	91
2.3.14 Протокол моделирования взаимодействий БСА с добавками	92
2.3.15 Оценка тушения флуоресценции триптофана БСА при комплексобразовании	93
2.3.16 Крио-трансмиссионная электронная микроскопия комплексов ...	94

2.3.17 Микропузырьки на основе БСА	94
2.3.18 Микропузырьки на основе комплексов БСА@П(ВП–АК) (ОДМ, 18 кДа)	94
2.3.19 Микропузырьки на основе библиотеки БСА@П(ВП–АК) (3,5–15 кДа)	95
2.3.20 Микропузырьки на основе комплексов БСА–ПАм.....	95
2.3.21 Флуоресцентно-меченные микропузырьки.....	96
2.3.22 Получение отмытых микропузырьков.....	96
2.3.23 Разрушение микропузырьков терапевтическим ультразвуком.....	96
2.3.24 Анализ серий ИК-Фурье спектров комплексов БСА@П(ВП–АК) и соответствующих микропузырьков	97
2.3.25 Обработка ИК-Фурье спектров для анализа структурных преобразований БСА и белково-композитных систем.....	98
2.3.26 Спектроскопия кругового дихроизма (КД)	100
2.3.27 Оптическая микроскопия	101
2.3.28. Сканирующая электронная микроскопия.....	102
2.3.29 Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия	102
2.3.30 Крио-трансмиссионная электронная микроскопия	103
2.3.31 Оценка акустического отклика	103
2.3.32 Исследование динамики кавитации в растворах материалов оболочки МП	104
2.3.33 Высокоскоростная видеорегистрация формирования предшественников МП	106
2.3.33 Оценка реологии крови в присутствии МП	107
2.3.34 Лазерная агрегометрия и эктацитометрия.....	108
2.3.35. Ультразвуковая визуализация <i>in vivo</i>	110

2.3.36. Анализ крови и исследование распределения в организме	111
2.3.37 Статистическая обработка данных	111
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	113
3.1. Исследуемые белково-композитные системы	114
3.2. Синтез, исследование структурных параметров сополимеров П(ВП-АК) и их физико-химических свойств	117
3.2.1. Амфифильный сополимер П(ВП-АК) с концевой октадецильной группой (18 кДа)	118
3.2.2 Синтез серии сополимеров П(ВП-АК) и анализ их самоорганизации в водной среде	120
3.3 Формирование белково-композитных комплексов БСА и влияние состава на их свойства	126
3.3.1. Межфазная активность комплексов БСА@П(ВП-АК) и обоснование выбора оптимальных массовых соотношений	129
3.3.2. Спектроскопическая характеристика модельного комплекса БСА@П(ВП-АК) ОДМ 18 кДа	132
3.3.3. Рамановская спектроскопия комплексов БСА@П(ВП-АК) с использованием полых микроструктурированных оптических волноводов	135
3.3.4. Формирование и характеристика библиотеки комплексов БСА@П(ВП-АК)	140
3.3.5. Моделирование методом молекулярно1 динамики комплексов БСА@П(ВП-АК)	148
3.3.6. Комплексы с низкомолекулярным стабилизатором спермином..	152
3.3.7. Сравнительный анализ взаимодействия БСА с низкомолекулярными и макромолекулярными стабилизирующими добавками	153

3.4. Структура и свойства белково-композитных микропузырьков.....	158
3.4.1. Получение и морфологическая характеристика БСА@П(ВП-АК) микропузырьков	158
3.4.3. Влияние состава и структуры БСА@П(ВП-АК) комплексов на концентрацию и свойства микропузырьков	163
3.4.4. Спектроскопическая характеристика белково-композитных микропузырьков БСА@П(ВП-АК)	168
3.4.5. Получение белково-композитных микропузырьков на основе различных типов комплексов.....	173
3.4.6. Структурная организация белка в оболочке микропузырьков	175
3.5 Кавитационная динамика формирования микропузырьков и её связь с составом белково-композитных систем.....	186
3.5.1. Подход к анализу динамики формирования микропузырьков	187
3.5.2. Кавитационная активность и формирование предшественников микропузырьков	189
3.5.3. Размерные характеристики предшественников микропузырьков и их эволюция в кавитационном поле.....	193
3.6. Акустические характеристики белково-композитных микропузырьков <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	198
3.6.1. Нелинейный акустический отклик микропузырьков в модели сосуда.....	199
3.6.2. Сравнение акустических характеристик микропузырьков с макромолекулярными и низкомолекулярными добавками	204
3.6.3. Эхоконтрастные свойства микропузырьков при эхокардиографии <i>in vivo</i>	207
3.7. Биосовместимость белково-композитных микропузырьков <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> и <i>ex vivo</i>	209

3.7.1. Влияние микропузырьков на реологические свойства крови <i>ex vivo</i>	209
3.7.2. Гематологические показатели после введения микропузырьков <i>in vivo</i> и биораспределение микропузырьков по данным флуоресцентной томографии <i>ex vivo</i>	213
3.8. Перспективы дальнейшей разработки темы	216
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	217
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	220

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

HGB – концентрация гемоглобина

HSQC – двумерная гетероядерная одноквантовая корреляционная ЯМР-спектроскопия (Heteronuclear Single Quantum Coherence)

IVIS – система оптической визуализации *In Vivo Imaging System*

MALDI-TOF – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролетной масс-спектрометрией

PLT – тромбоциты

RBC – эритроциты

Rh6G – родамин 6G

WBC – лейкоциты

АК – акриловая кислота

АСМ – атомно-силовая микроскопия

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВП – *N*-винил-2-пирролидон

ДСР – динамическое светорассеяние

ИК-Фурье спектроскопия – инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье

ИА – индекс агрегации

НПВО – нарушенное полное внутреннее отражение

КД – круговой дихроизм

КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

ККА – критическая концентрация агрегации

КСН – Критическое сдвиговое напряжение

МД – молекулярная динамика

МП – микропузырьки

НК – нелинейный контраст

НКР – нелинейный контрастный режим

ОДМ – *n*-октадецилмеркаптан

ОМ – n-октилмеркаптан

ОМ – оптическая микроскопия*

П(ВП-АК) – сополимер *N*-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты

ПАм – полиамин спермин

пМП – газонаполненные предшественники микропузырьков

ПМОВ – полые микроструктурированные оптические волноводы

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

крио-ПЭМ – криогенная просвечивающая электронная микроскопия

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

УЗ – ультразвук

УЗИ – ультразвуковое исследование

ЭхГСС – эхогенность газосодержащих структур

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

ВВЕДЕНИЕ

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 эхогенность 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.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В разделе рассмотрено современное состояние исследований в области ультразвуковых контрастных агентов, их состав, механизмы формирования и акустические свойства. Проанализированы белковые микропузырьки, их преимущества и ограничения, связанные с недостаточной стабильностью и воспроизводимостью. Рассмотрены амфифильные полимеры и их роль в формировании межфазных слоёв. Изложены физико-химические основы образования белково-полимерных комплексов, включая межмолекулярные взаимодействия и влияние состава и условий среды на структуру и устойчивость систем. Показано, что структура межфазной оболочки и конформационное состояние белка определяют свойства микропузырьков. Анализ литературных данных позволил обосновать цель настоящего диссертационного исследования.

1.1. Ультразвук как физико-химический фактор воздействия на межфазные системы

1.1.1. Физические принципы распространения ультразвуковых волн в конденсированных средах

На сегодняшний день ультразвуковое исследование (УЗИ) является одним из наиболее распространённых методов медицинской и ветеринарной диагностики. Метод основан на распространении в биологических тканях продольных акустических волн мегагерцевого диапазона и регистрации отражённых сигналов, возникающих на границах раздела сред с различными акустическими свойствами. Основной характеристикой среды является акустический импеданс, определяемый выражением

$$Z = \rho c, \quad (1.1)$$

где ρ - плотность среды, а c - скорость распространения звука. Чем больше различие акустических импедансов соседних сред, тем выше коэффициент отражения ультразвуковой волны и интенсивность

регистрируемого эхосигнала [7–10]. Для мягких тканей среднюю скорость распространения ультразвука обычно принимают равной 1540 м/с. Однако она зависит от состава и механических свойств ткани, что может влиять на точность определения глубины расположения отражающих структур [11] (рис. 1.1). Рабочую частоту ультразвука выбирают с учётом глубины исследования и требуемого пространственного разрешения. Частоты 1–5 МГц используют для исследования глубоко расположенных органов, поскольку ультразвук при этом слабее затухает в тканях. Частоты 7–15 МГц и выше применяют для получения изображений поверхностных структур с более высоким разрешением [8, 12]. В медицине используют ультразвуковые колебания от десятков килогерц в терапевтических и хирургических методах до нескольких десятков мегагерц в диагностике [13–15].

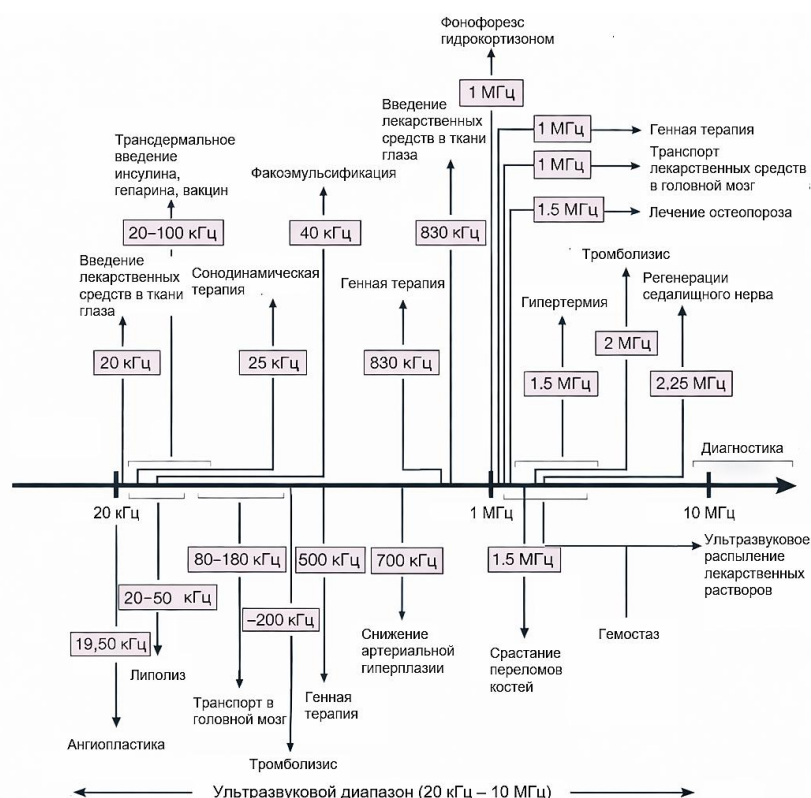


Рисунок 1.1. Области применения ультразвукового воздействия в зависимости от частоты. *Источник: адаптировано по [13].*

Биологическое действие ультразвука определяется его частотой, интенсивностью, акустическим давлением, длительностью импульсов и временем воздействия. В диагностических режимах используют низкие

интенсивности, обеспечивающие получение качественного изображения при минимальном воздействии на ткани. При увеличении интенсивности возрастают механические и тепловые эффекты, а высокоинтенсивный фокусированный ультразвук (HIFU) способен вызывать локальный нагрев тканей и их термическую абляцию [13, 16–19].

Интенсивность ультразвука характеризует поток акустической энергии, проходящей через единицу площади за единицу времени, и для плоской гармонической волны определяется выражением

$$I = \frac{p_{\text{rms}}^2}{\rho c} \quad (1.2)$$

где p_{rms} – среднеквадратичное значение акустического давления. Интенсивность пропорциональна квадрату акустического давления и зависит от акустических свойств среды [12, 16, 18] (рис. 1.2). Развитие тепловых эффектов определяется преимущественно средней интенсивностью ультразвука, тогда как вероятность возникновения кавитации — амплитудой отрицательного акустического давления, частотой ультразвука и наличием газовых включений в среде [13, 17, 19].

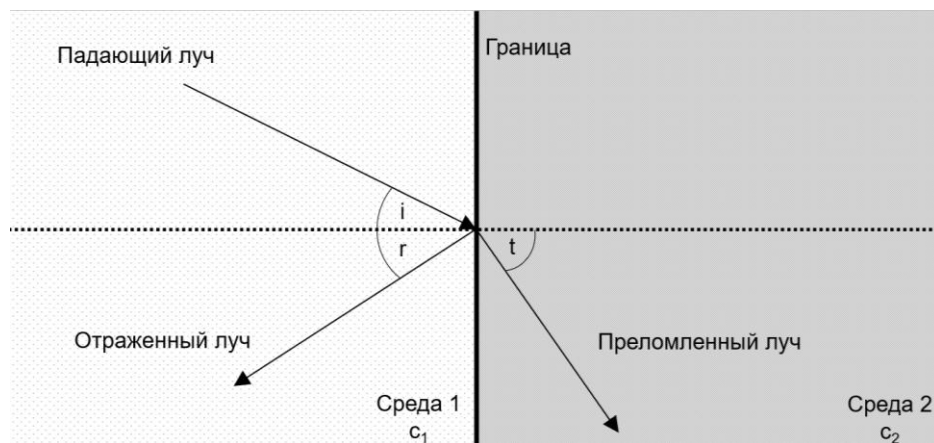


Рисунок 1.2. Отражение и преломление ультразвуковой волны на границе двух сред с различным акустическим импедансом: a – схема распространения ультразвуковой волны; i – угол падения; r – угол отражения; t – угол преломления; c_1 и c_2 – скорости распространения звука в первой и второй средах соответственно. *Источник: адаптировано по [7].*

1.1.2. Взаимодействие ультразвука с гетерогенными и коллоидными системами, нелинейные эффекты в биологических и модельных средах

Биологические ткани и модельные водные среды представляют собой гетерогенные системы с неоднородностями различного масштаба. При распространении ультразвука в таких средах происходят отражение, рассеяние, преломление и затухание акустической волны. Отражение формирует эхосигнал, рассеяние определяет эхотекстуру изображения и используется в доплеровских режимах, преломление вызывает геометрические искажения, а затухание ограничивает глубину визуализации [8, 9, 11, 12] (рис. 1.3). Характер взаимодействия ультразвука со средой определяется соотношением длины волны и размера неоднородностей. В мягких тканях рассеяние на клетках, волокнах и других микроскопических структурах формирует характерную эхотекстуру изображения [9, 20]. В коллоидных и дисперсных системах дополнительный вклад в отражение ультразвука вносят границы раздела компонентов с различными акустическими свойствами, поэтому даже небольшие различия плотности и скорости распространения звука изменяют амплитуду отражённого сигнала.

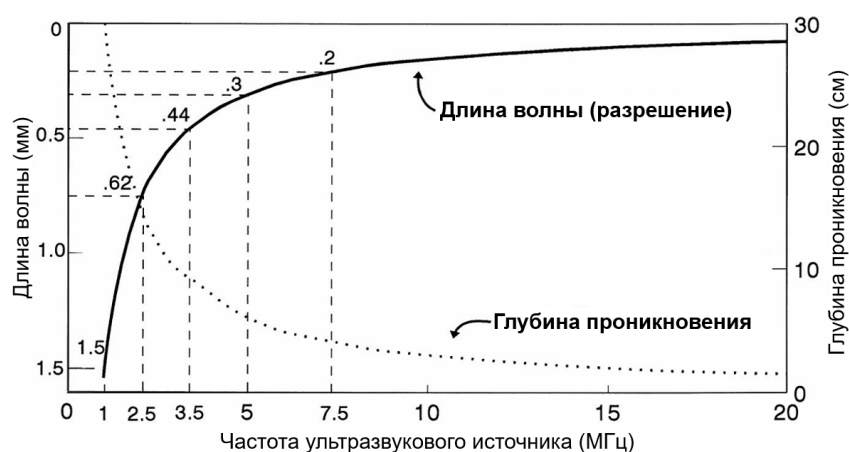


Рисунок 1.3. Сопоставление разрешающей способности и глубины проникновения ультразвуковых волн при использовании датчиков различной частоты. *Источник: адаптировано по [8].*

Затухание акустических волн в биологических тканях описывается зависимостью

$$\alpha(f) = \alpha_0 f^n, \quad (1.3)$$

где показатель n для большинства мягких тканей близок к единице. Вследствие этого коэффициент затухания практически линейно возрастает с увеличением частоты ультразвука. Данная зависимость определяет один из фундаментальных компромиссов ультразвуковой визуализации: повышение рабочей частоты улучшает пространственное разрешение, однако одновременно уменьшает глубину проникновения ультразвука в ткани [8, 10, 12]. Поглощение ультразвуковой энергии обусловлено вязкоупругими свойствами среды и сопровождается преобразованием части механической энергии в тепловую. В диагностических режимах нагрев тканей, как правило, незначителен, однако при увеличении акустического давления и времени воздействия вклад тепловых эффектов возрастает, что используется в терапевтических ультразвуковых технологиях [14, 16].

Помимо линейных процессов, при распространении ультразвука в гетерогенных и коллоидных системах реализуются нелинейные акустические эффекты, возникающие при конечной амплитуде колебаний частиц среды. Наибольшее практическое значение среди них имеет акустическая кавитация – образование, рост и схлопывание газовых полостей под действием переменного акустического давления. Вероятность возникновения кавитации определяется прежде всего амплитудой отрицательного акустического давления, частотой ультразвука и наличием в среде газовых включений, тогда как развитие тепловых эффектов в большей степени связано со средней интенсивностью ультразвукового воздействия [17–24].

1.1.3. Ограничения стандартной ультразвуковой визуализации как отражение физико-химических свойств тканей

Стандартная ультразвуковая визуализация имеет ряд ограничений, связанных с физическими свойствами биологических тканей. Одной из основных причин является низкий акустический контраст крови относительно окружающих тканей. Акустические импедансы плазмы, форменных

элементов крови и мягких тканей близки, поэтому кровь формирует слабый эхосигнал по сравнению с сосудистой стенкой и окружающими тканями [8, 12]. Эритроциты имеют размер 7–8 мкм, что значительно меньше длины волны диагностического ультразвука (150–1000 мкм). Поэтому рассеяние ультразвука носит преимущественно рэлеевский характер и сопровождается низкой интенсивностью обратно рассеянного сигнала, вследствие чего кровь является слабым естественным рассеивателем ультразвука [20, 25]. Это ограничивает визуализацию сосудов и микроциркуляторного русла. В стандартных режимах ультразвуковой диагностики просвет сосудов и камеры сердца выглядят как области с низкой эхогенностью, что затрудняет оценку перфузии тканей и выявление нарушений микроциркуляции [26].

Ещё одним ограничением является частотно-зависимое затухание ультразвука. С увеличением частоты существенно возрастает ослабление сигнала в тканях (интенсивность рэлеевского рассеяния пропорционально частоте в 4 степени), уменьшается глубина проникновения ультразвука и ухудшается визуализация глубоко расположенных сосудов, особенно малого диаметра. Совокупность перечисленных ограничений обусловила разработку ультразвуковых контрастных препаратов, позволяющих существенно увеличить интенсивность обратного рассеяния, повысить контрастность сосудистого русла и расширить возможности визуализации микроциркуляции и тканевой перфузии [27–29].

1.2. Контрастные агенты для ультразвуковой диагностики.

Газонаполненные микропузырьки как физико-химические межфазные системы

1.2.1 Контрастные агенты как искусственно вводимые акустически активные межфазные структуры

Современные ультразвуковые контрастные препараты усиливают эхосигнал благодаря большому различию акустических импедансов газа и жидкости, а также нелинейным колебаниям газонаполненных структур в

акустическом поле. Выделяют три основные группы ультразвуковых контрастных агентов: микропузырьки, субмикронные газосодержащие системы (нанопузырьки, нанок капли и экзогенные липосомы) и наночастицы, образующие газовую фазу непосредственно в области ультразвукового воздействия [5, 29–32].

1. Газовые микропузырьки

Газонаполненные микропузырьки диаметром 1–10 мкм являются единственным клинически применяемым классом внутривенных ультразвуковых контрастных препаратов [31, 33–35]. Благодаря большому различию акустических импедансов газового ядра и окружающей жидкости они эффективно рассеивают ультразвук, значительно усиливая эхосигнал [31, 36–39]. Акустический отклик микропузырьков имеет нелинейный характер. При низком механическом индексе ($MI = P_r / \sqrt{f_c}$, где P_r — пиковое отрицательное давление, МПа; f_c — частота ультразвука, МГц; $MI < 0,1$) наблюдаются преимущественно линейные радиальные колебания. При $0,1 < MI < 0,5$ возникают нелинейные колебания с генерацией гармоник и субгармоник, лежащих в основе современных контрастных режимов ультразвуковой визуализации. При дальнейшем увеличении акустического давления происходят разрушение оболочки и коллапс микропузырьков, сопровождающиеся кратковременным высокоамплитудным акустическим сигналом [33, 36, 40–48]. Нелинейное поведение микропузырьков связано с акустической кавитацией. При сравнительно низких амплитудах акустического давления развивается стабильная кавитация, при которой пузырьки многократно колеблются без разрушения. При более высоких амплитудах возникает инерциальная кавитация, сопровождающаяся быстрым ростом и последующим коллапсом пузырьков, локальным выделением энергии, образованием ударных волн и микроструй [21, 22, 41, 43, 49].

Разработка клинических контрастных препаратов была направлена на повышение стабильности микропузырьков и увеличение времени их

циркуляции в крови. Препараты первого поколения содержали воздухом наполненные микропузырьки, полученные механическим перемешиванием или встряхиванием суспензий (например, Эховист и Альбунекс). В препаратах второго поколения воздух заменили плохо растворимыми в крови газами — перфторуглеродами или гексафторидом серы, а для стабилизации границы раздела использовали липидные, белковые или полимерные оболочки. К ним относятся препараты Оптисон, Дефинити (Luminity), Соновью (Lumason) и Соназоид [29, 31, 33–35, 39]. Состав оболочки определяет механические и акустические свойства микропузырьков. Липидные оболочки обладают высокой эластичностью и обеспечивают выраженное нелинейное акустическое поведение. Белковые оболочки отличаются большей механической прочностью, а полимерные — максимальной стабильностью, но меньшей амплитудой колебаний из-за высокой жёсткости [31, 40, 48–52]. Вместе с тем, микропузырьки имеют ряд ограничений. Их размеры превышают размеры межэндотелиальных пор большинства сосудов, поэтому они остаются в сосудистом русле и не проникают в интерстициальное пространство. Кроме того, время их циркуляции обычно ограничено несколькими минутами, что сокращает диагностическое окно и ограничивает возможности визуализации ряда патологических процессов [5, 29, 32, 35, 50, 52–54].

2. Субмикронные и наноразмерные газовые и жидкостные агенты

Наряду с микропузырьками активно развиваются субмикронные ультразвуковые контрастные агенты, включая нанопузырьки, нанокapли и экзогенные липосомы. Благодаря меньшим размерам они способны выходить за пределы сосудистого русла и накапливаться в патологических тканях, что расширяет возможности молекулярной визуализации и адресной доставки лекарственных веществ [29, 39, 55–61].

2.1. Нанопузырьки

Нанопузырьки размером 100–600 нм содержат газовое ядро, стабилизированное липидной, полимерной или гибридной оболочкой [30, 55,

61–64]. Благодаря малым размерам они способны проникать через участки повышенной сосудистой проницаемости опухолей и дольше удерживаться в патологическом очаге по сравнению с микропузырьками [55–57, 62].

Собственная резонансная частота нанопузырьков значительно превышает рабочий диапазон клинических ультразвуковых систем (30–200 МГц против 1–12 МГц). Поэтому эхосигнал формируется преимущественно за счёт нелинейных колебаний оболочки, генерации субгармоник и локальных кавитационных процессов [55, 61–65].

2.2. Нанокapли

Нанокapли размером 150–300 нм содержат жидкое ядро из низкокипящих перфторуглеродов (например, перфторпентана или перфторгексана) и относятся к фазопереходным контрастным агентам. Под действием ультразвука происходит акустическая капельная vaporизация — переход жидкого ядра в газовую фазу с образованием микропузырьков в зоне воздействия [58–71]. Образующиеся микропузырьки обеспечивают локальное усиление эхосигнала, сохраняя преимущества наноразмерных систем до момента активации. Кроме того, нанокapли рассматривают как платформы для локальной доставки лекарственных препаратов и ультразвуковая кавитация. Основным ограничением является необходимость достаточно высокого акустического давления для запуска фазового перехода [63–74].

2.3. Эхогенные липосомы и гибридные наноагенты

Эхогенные липосомы представляют собой липидные везикулы с газовыми включениями или полостями, усиливающими ультразвуковой сигнал. Они отличаются высокой биосовместимостью, возможностью модификации поверхности и совместной доставки лекарственных веществ [5, 75–80]. К перспективным ультразвуковым контрастным агентам также относятся гибридные липидно-полимерные, липидно-неорганические системы и газовые белковые везикулы, сочетающие высокую стабильность, возможность молекулярного распознавания и, в ряде случаев, генетически программируемую структуру [61, 63, 81–84].

3. Твёрдые наночастицы

Отдельную группу составляют твёрдые наночастицы, содержащие микроскопические газовые полости либо способные генерировать газ непосредственно в ткани под действием внешних или внутренних стимулов [5, 85–92]. К ним относятся пористый кремний, оксиды металлов, углеродные материалы и реагент-чувствительные наночастицы, генерирующие кислород или углекислый газ при взаимодействии с компонентами патологической ткани. В частности, H_2O_2 -чувствительные наночастицы способны продуцировать кислород непосредственно в очаге воспаления или опухоли, обеспечивая продолжительное усиление ультразвукового сигнала и одновременно отражая локальное биохимическое состояние ткани [85, 88, 90, 93].

Таблица 1.1. Сводная таблица ультразвуковых контрастных средств

Класс	Подтип	Размер	Особенности	Основные ограничения	Источники
Газонаполненные микропузырьки	Микропузырьковые контрастные агенты	1–10 мкм	Газовое ядро; Примеры: Оптисон (альбуминовая оболочка), Соновью (липидная оболочка), Соновист (полимерная оболочка)	Внутрисосудистое распределение	[29, 33, 39]
Газонаполненные микропузырьки	I поколение	2–8 мкм	Воздухонаполненные микропузырьки	Низкая стабильность	[33, 39]
Наноагенты	Нанопузырьки	100–600 нм	Газовое ядро	Высокая стабильность, возможна экстравазация	[30, 55, 57, 61–65]

Наноагенты	Нанокапли	150–300 нм	Жидкое ядро из перфторуглеродов	Требуют акустической активации	[5, 58–74]
Наноагенты	Эхогенные липосомы	100–400 нм	Газовые включения в липосомах	Умеренная эхогенность	[5, 75–80]
Газогенерирующие наночастицы	Реагент-чувствительные системы	50–250 нм	Генерация газа <i>in situ</i>	Стадия доклинических исследований	[85–93]

Газонаполненные микропузырьки остаются наиболее изученным и единственным широко применяемым в клинической практике классом ультразвуковых контрастных препаратов, несмотря на активное развитие наноразмерных контрастных агентов [94, 95]. Новое направление исследований связано с использованием микропузырьков для ультразвуковой доставки лекарственных веществ и сонопорации, позволяющих временно повышать проницаемость клеточных мембран и биологических барьеров. Особое внимание уделяют возможности обратимого открытия гематоэнцефалического барьера как перспективному способу доставки лекарственных препаратов в центральную нервную систему [96–100].

1.2.2. Термодинамическая неустойчивость газовых пузырьков в жидкостях, поверхностное натяжение, давление Лапласа и диффузия газа

Для понимания роли межфазной оболочки в стабилизации микропузырьков целесообразно сначала рассмотреть поведение свободного газового пузырька в жидкости. В отсутствие оболочки газовый пузырёк представляет собой термодинамически неустойчивую систему. Причиной такой неустойчивости является повышенное давление газа внутри пузырька, возникающее вследствие кривизны межфазной поверхности. Согласно закону Юнга–Лапласа, разность давлений между внутренней и внешней сторонами сферической поверхности определяется выражением

$$\Delta P = P_g - P_L = \frac{2\sigma}{R}, \quad (1.4)$$

где P_g – давление газа внутри пузырька, P_L – давление окружающей жидкости, σ – коэффициент поверхностного натяжения, R – радиус пузырька.

Поскольку давление Лапласа обратно пропорционально радиусу пузырька, его вклад особенно велик для микро- и субмикронных пузырьков. Высокое внутреннее давление увеличивает равновесную растворимость газа на границе раздела фаз, создавая градиент концентрации между поверхностью пузырька и окружающей жидкостью. В результате газ диффундирует в жидкость, что приводит к постепенному растворению пузырька [101, 102].

Эпштейн и Плессет показали, что скорость растворения свободного пузырька определяется диффузией газа через границу раздела фаз и зависит от коэффициента диффузии, степени насыщения жидкости, температуры, внешнего давления и кривизны поверхности пузырька [101]. В недонасыщенной водной среде микронные пузырьки быстро растворяются, поэтому существуют лишь короткое время. Использование плохо растворимых перфторуглеродов значительно замедляет этот процесс, но не устраняет фундаментальную капиллярную неустойчивость системы [36, 103, 104].

Диффузионное растворение пузырька следует отличать от его радиальной динамики под действием переменного акустического давления. Последняя описывается уравнением Рэлея–Плессета, представляющим собой баланс инерционных, капиллярных, вязких и газодинамических сил, действующих на межфазную границу пузырька [102, 104–107]:

$$\rho_L \left(R \frac{d^2 R}{dt^2} + \frac{3}{2} \left(\frac{dR}{dt} \right)^2 \right) = P_g(R, t) + p_v - P_\infty(t) - \frac{2\sigma}{R} - \frac{4\mu_L}{R} \frac{dR}{dt}, \quad (1.5)$$

где $R(t)$ – мгновенный радиус пузырька; ρ_L и μ_L – плотность и динамическая вязкость жидкости; P_g – давление газа внутри пузырька; p_v –

давление насыщенного пара жидкости; P_∞ — давление в жидкости вдали от пузырька.

При политропическом изменении состояния газа давление внутри пузырька определяется выражением

$$P_g(R) = \left(P_0 + \frac{2\sigma}{R_0} - p_v \right) \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3\kappa}, \quad (1.6)$$

где P_0 — давление жидкости в исходном состоянии, R_0 — равновесный радиус пузырька, κ — показатель политропы.

Уравнение Рэля–Плессета описывает механическое движение границы раздела фаз, но не учитывает изменение массы газа вследствие его диффузии. Поэтому для описания длительной устойчивости пузырька необходимо совместно учитывать его механическую динамику и массоперенос газа. Современные модели также учитывают влияние оболочки, изменяющей поверхностное натяжение, поверхностную вязкость, упругость и газопроницаемость границы раздела фаз [104, 108].

Свободный микронный газовый пузырёк не способен длительно существовать в водной среде из-за совместного действия капиллярного давления и диффузии газа. Оболочка снижает эффективное поверхностное натяжение, ограничивает диффузию газа и придаёт границе раздела фаз вязкоупругие свойства, изменяя как устойчивость пузырька, так и его акустическое поведение.

1.2.3. Межфазная оболочка как фактор стабилизации газовой фазы

Как отмечено в подразделе 1.2.2, свободные газовые пузырьки термодинамически неустойчивы в водной среде из-за высокого давления Лапласа и вызванной им диффузии газа в окружающую жидкость. Поэтому длительное существование газовой фазы возможно только при наличии оболочки, которая снижает эффективное поверхностное натяжение,

ограничивает диффузию газа через границу раздела фаз и вносит дополнительный механический вклад в баланс сил на поверхности пузырька. Кроме того, оболочка определяет вязкоупругие свойства границы раздела фаз и существенно влияет на радиальные колебания микропузырьков в акустическом поле [104, 108].

Современные ультразвуковые контрастные препараты начали разрабатывать в конце 1980-х — начале 1990-х годов после появления воспроизводимых методов инкапсуляции газового ядра, позволивших получать стабильные микропузырьки, пригодные для клинического применения (рис. 1.4). В дальнейшем использование малорастворимых перфторуглеродов и совершенствование технологий формирования липидных, белковых и полимерных оболочек привели к созданию препаратов второго поколения с более высокой стабильностью и воспроизводимыми акустическими характеристиками [12, 33, 109].

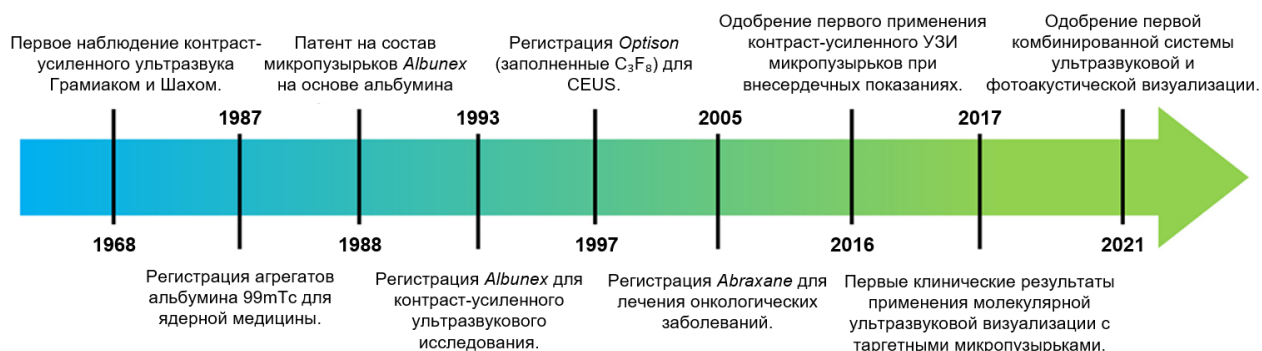


Рисунок 1.4. Микропузырьки с альбуминовой оболочкой для ультразвуковой визуализации. Временная шкала основных этапов развития ультразвуковых контрастных препаратов и альбуминовых микропузырьков.

Источник: адаптировано по [109].

В настоящее время микропузырьки остаются единственным широко применяемым в клинической практике классом внутривенных ультразвуковых контрастных препаратов. Они зарегистрированы более чем в 70 странах и используются при контрастной эхокардиографии, исследованиях

печени, сосудистой патологии и онкологических заболеваний. По данным крупных клинических исследований, частота тяжёлых нежелательных реакций составляет 0,004–0,009 %, что сопоставимо с безопасностью других контрастных препаратов [20, 94].

Микропузырьки представляют собой частицы диаметром 1–10 мкм с воздушным ядром или ядром из малорастворимых газов — перфторпропана (C_3F_8), перфторбутана (C_4F_{10}) или гексафторида серы (SF_6), — стабилизированным белковой, липидной или полимерной оболочкой. Использование малорастворимых газов замедляет их диффузию и увеличивает время циркуляции микропузырьков в сосудистом русле до нескольких минут, что позволяет проводить исследования кровотока и тканевой перфузии в режиме реального времени [36].

Межфазная оболочка определяет акустические свойства микропузырьков. Она стабилизирует газовое ядро, влияет на поверхностную вязкость и упругость, ограничивает газопроницаемость, регулирует амплитуду радиальных колебаний и влияет на возникновение нелинейных акустических эффектов. Согласно современным представлениям, оболочка является вязкоупругой структурой, механические свойства которой изменяются при сжатии и расширении, включая локальную потерю устойчивости и разрыв [104, 108].

Благодаря высокой сжимаемости газа и сравнительно мягкой оболочке микропузырьки совершают асимметричные циклы расширения и сжатия, сопровождающиеся генерацией гармоник, субгармоник и ультрагармоник. Это позволяет отделять сигнал контрастного препарата от сигнала тканей и обеспечивает высокую чувствительность современных контрастных режимов ультразвуковой визуализации даже при низких концентрациях микропузырьков [36].

Стабильность микропузырьков второго поколения и их предсказуемое акустическое поведение позволили разработать стандартизированные протоколы контрастной эхографии и расширить возможности оценки тканевой перфузии, микроциркуляции и функционального состояния органов [20, 94].

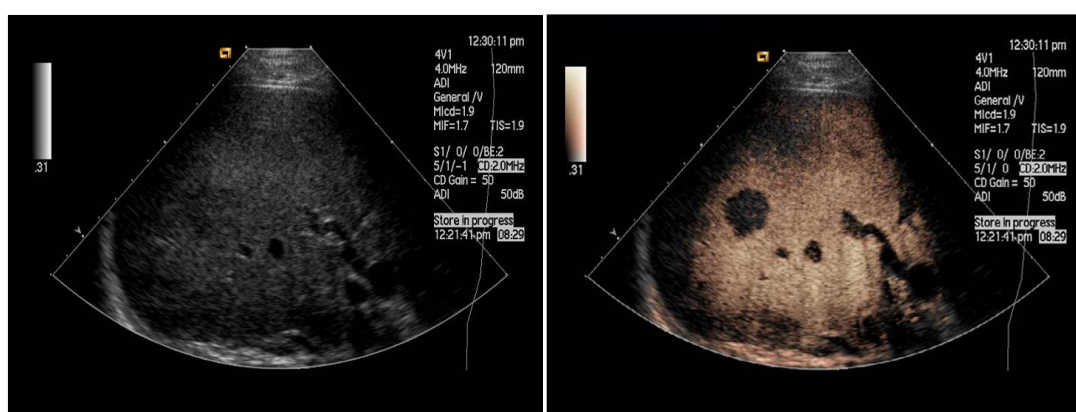


Рисунок 1.5. Контрастное усиление ультразвукового изображения печени. а) исследование без контрастного препарата; б) изображение после введения микропузырькового контрастного агента, позволяющее визуализировать метастатический очаг. *Источник: адаптировано по [12].*

Сравнительная характеристика оболочек микропузырьков

Межфазная оболочка определяет устойчивость газовой фазы, скорость диффузии газа, механическую прочность микропузырьков и их взаимодействие с ультразвуком. Выделяют три основных типа оболочек — липидные, белковые и полимерные. Несмотря на общую функцию стабилизации газового ядра, они различаются по строению, механическим свойствам, газопроницаемости и нелинейному акустическому поведению, что определяет области их применения [33, 36].

Липидные оболочки

Липидные оболочки представляют собой монослой фосфолипидов толщиной несколько нанометров, формирующиеся в результате самопроизвольной ориентации амфифильных молекул на границе раздела газ—

жидкость. Благодаря низкому поверхностному натяжению и высокой подвижности молекул они обладают высокой сжимаемостью и способны изменять поверхностную плотность при акустических колебаниях [110, 111].

Эти свойства обуславливают выраженное нелинейное поведение липидных микропузырьков. Согласно современным представлениям, при сжатии оболочка может локально терять устойчивость, а при сильном растяжении — локально разрушаться. Такие обратимые изменения сопровождаются генерацией гармоник, субгармоник и ультрагармоник, лежащих в основе контрастных режимов ультразвуковой визуализации [104].

Механические свойства липидной оболочки зависят от её состава. Изменение длины и степени насыщенности углеводородных цепей, добавление холестерина, ПЭГ-липидов и других компонентов позволяет регулировать поверхностную вязкость, упругость, устойчивость к многократному ультразвуковому воздействию и вероятность разрушения микропузырьков [36, 113].

Полимерные оболочки

Полимерные оболочки представляют собой трёхмерные вязкоупругие капсулы толщиной от десятков до сотен нанометров, образованные плотными макромолекулярными сетями, часто дополнительно химически сшитыми. Такая структура обеспечивает более низкую газопроницаемость по сравнению с липидными оболочками и способствует длительному сохранению газового ядра [1, 36, 113].

Высокая жёсткость полимерной оболочки ограничивает амплитуду радиальных деформаций микропузырьков и снижает выраженность их нелинейного поведения. Поэтому полимерные микропузырьки обычно уступают липидным по эффективности контрастирования, но отличаются большей механической устойчивостью и более длительным временем существования в жидкой среде. Кроме того, химическая стабильность и

возможность модификации поверхности делают полимерные оболочки перспективными носителями для адресной доставки лекарственных веществ и создания многофункциональных терапевтических систем [110].

Белковые оболочки

Белковые оболочки формируются при адсорбции молекул белка на границе раздела газ–жидкость с последующими конформационными изменениями и образованием сети межмолекулярных взаимодействий. В отличие от липидных монослоёв и полимерных капсул они представляют собой гидратированную межфазную структуру, свойства которой определяются составом белка и условиями формирования оболочки [108, 109].

По сравнению с липидными оболочками белковые обладают большей механической прочностью, сохраняя способность к нелинейным радиальным колебаниям. Дополнительным преимуществом является наличие реакционноспособных функциональных групп, позволяющих модифицировать поверхность. Экспериментальные исследования показывают, что дегазация белковых микропузырьков часто протекает в две стадии: период относительной стабильности сменяется ускоренным растворением газа, связанным с постепенной перестройкой белковой межфазной сети [114].

Сопоставление и аналитические выводы

Механические свойства оболочки определяются компромиссом между устойчивостью газовой фазы и эффективностью нелинейного акустического поведения. Липидные оболочки обладают минимальной жёсткостью и обеспечивают наиболее выраженную нелинейность колебаний, поэтому их широко используют в клинической контрастной эхографии (рис. 1.6). Полимерные оболочки отличаются максимальной механической прочностью, низкой газопроницаемостью и длительным временем существования, однако высокая жёсткость ограничивает амплитуду радиальных деформаций и

снижает эффективность нелинейного контрастирования. Белковые оболочки занимают промежуточное положение, сочетая механическую устойчивость, выраженное нелинейное поведение и возможность химической модификации [36, 109].

Для настоящей работы наибольший интерес представляют белковые оболочки, поскольку их свойства можно регулировать за счёт изменения межмолекулярных взаимодействий, степени структурной организации и введения функциональных компонентов. Разработка белково-композитных оболочек является логичным направлением развития контрастных агентов на основе микропузырьков, поскольку позволяет сочетать высокую устойчивость, выраженные акустические свойства и возможность дальнейшей функциональной модификации.

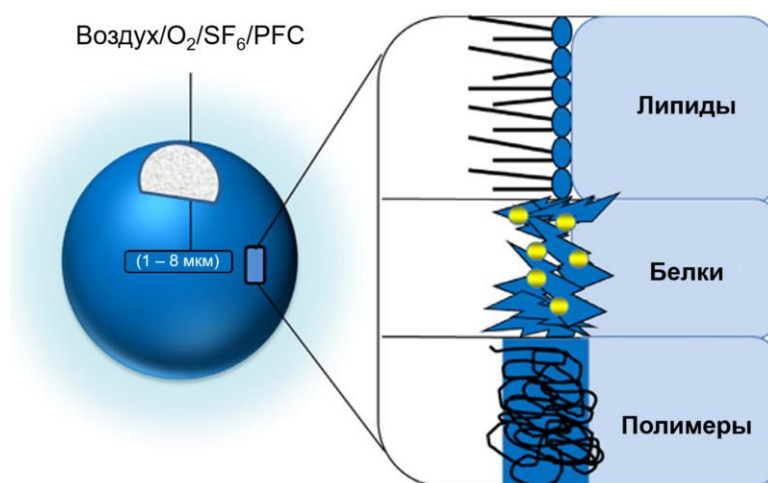


Рисунок 1.6. Схематическое строение типичного ультразвукового микропузырька диаметром 1–10 мкм, содержащего газовое ядро (воздух, перфторуглероды или гексафторид серы) и стабилизирующую оболочку липидной, белковой или полимерной природы. *Источник: адаптировано по [103].*

Обобщая представленные данные, белковые микропузырьки отличаются от липидных и полимерных систем строением межфазной оболочки. Она представляет собой белковую сеть, свойства которой

определяются процессами адсорбции, конформационных изменений и межмолекулярных взаимодействий. Благодаря этому механические свойства оболочки можно регулировать, изменяя условия формирования микропузырьков, что позволяет управлять их устойчивостью, нелинейным акустическим поведением и функциональными свойствами [104, 109].

1.2.4. Акустический отклик микропузырьков и его связь с реологическими параметрами оболочки

Межфазная оболочка определяет не только устойчивость газового ядра, но и динамику микропузырька в акустическом поле. При воздействии ультразвука она деформируется вместе с границей раздела фаз, внося упругий и вязкий вклад в баланс сил. Поэтому амплитуда радиальных колебаний, резонансная частота, диссипативные потери и спектр рассеянного сигнала зависят от её механических свойств [115–117].

Акустическое поведение микропузырьков характеризуется амплитудой и фазой радиальных колебаний, резонансной частотой, генерацией гармоник, субгармоник и ультрагармоник, а также переходом к неустойчивым режимам и разрушению пузырька. Даже при одинаковых размерах и параметрах ультразвукового воздействия микропузырьки с разными оболочками могут существенно различаться по интенсивности рассеяния и порогам нелинейного поведения [25, 118].

К основным реологическим параметрам оболочки относятся поверхностная упругость и поверхностная вязкость. Первая характеризует сопротивление изменению площади поверхности, вторая — диссипацию энергии при её деформации. Для оболочек конечной толщины дополнительно учитывают модуль сдвига, объёмную вязкость, толщину слоя и процессы структурной релаксации [116, 119].

Повышение упругости увеличивает жёсткость системы, сопровождаясь ростом резонансной частоты и уменьшением амплитуды радиальных

колебаний. Увеличение вязкости усиливает демпфирование и снижает амплитуду как основной, так и нелинейных составляющих акустического сигнала [104, 117].

Для липидных оболочек характерны малая толщина, высокая подвижность молекул и нелинейная зависимость поверхностного натяжения от площади поверхности. При сжатии возможно образование складок, сопровождающееся уменьшением эффективного поверхностного натяжения, а при растяжении — расправление оболочки и её последующий разрыв. Это приводит к асимметрии циклов расширения и сжатия пузырька и способствует генерации субгармоник и ультрагармоник уже при сравнительно низких акустических давлениях [118, 120].

Реологические свойства липидной оболочки зависят от её состава, длины и степени насыщенности углеводородных цепей, фазового состояния, содержания липидов, модифицированных полиэтиленгликолем, а также условий получения микропузырьков. Поэтому значения поверхностной упругости и вязкости могут различаться как между препаратами, так и между отдельными микропузырьками одной дисперсии [112].

Полимерные оболочки отличаются большей толщиной, упругостью и вязкостью. Их высокая жёсткость ограничивает радиальные деформации, усиливает демпфирование и может смещать резонансную частоту в область более высоких значений. Такие микропузырьки обладают высокой механической устойчивостью, однако для формирования выраженного нелинейного поведения обычно требуют более высоких акустических давлений [121].

Белковые оболочки занимают промежуточное положение между липидными монослоями и полимерными капсулами. Их свойства определяются адсорбцией, конформационными изменениями белка, образованием межмолекулярных контактов и неоднородностью межфазного

слоя. Реологические характеристики таких оболочек зависят от способа получения микропузырьков, состава среды, температуры и амплитуды деформации [108, 109].

Исследования альбуминовых микропузырьков показали, что утрата газа сопровождается постепенной перестройкой белковой оболочки и изменением её сопротивления массопереносу [114]. Вместе с тем акустическое поведение белковых микропузырьков изучено значительно меньше, чем липидных, что связано с неоднородностью структуры оболочки и широким распределением микропузырьков по размерам.

В совокупности рассмотренные факторы определяют акустическое поведение микропузырьков. Повышение жёсткости оболочки способствует стабилизации газового ядра, но уменьшает амплитуду колебаний, тогда как увеличение вязкости усиливает демпфирование и снижает интенсивность рассеянного сигнала. Количественное описание этих закономерностей основано на математических моделях динамики микропузырьков с оболочкой, которые рассмотрены в следующем подразделе.

1.2.5. Основные модели динамики микропузырьков

Математическое описание динамики микропузырьков основано на уравнении Рэлея–Плессета (см. подраздел 1.2.2). Для описания контрастных агентов на основе микропузырьков были разработаны модели, учитывающие сжимаемость жидкости, а также упругие, вязкие и нелинейные свойства межфазной оболочки [104, 117, 122].

Уравнение Келлера–Миксиса

При интенсивном акустическом воздействии скорость движения поверхности пузырька становится сравнимой со скоростью звука в жидкости, поэтому необходимо учитывать её сжимаемость. Это реализовано в уравнении Келлера–Миксиса, которое является развитием уравнения Рэлея–Плессета [122, 123]:

$$\left(1 - \frac{\dot{R}}{c}\right) R \ddot{R} + \frac{3}{2} \left(1 - \frac{\dot{R}}{3c}\right) \dot{R}^2 = \frac{1}{\rho_L} \left(1 + \frac{\dot{R}}{c} + \frac{R}{c} \frac{d}{dt}\right) (P_B - P_\infty) \quad (1.7)$$

где R - радиус пузырька; c - скорость звука в жидкости; ρ_L - плотность жидкости; P_B - давление на внутренней поверхности пузырька; P_∞ - давление в жидкости вдали от пузырька.

Модель учитывает сжимаемость жидкости, конечную скорость распространения акустического возмущения и связанные с этим потери энергии, поэтому широко применяется при моделировании нелинейных колебаний микропузырьков [122–125].

Модели вязкоупругой оболочки

Следующим этапом стало развитие моделей, учитывающих механические свойства межфазной оболочки. В модели Черча оболочка впервые рассматривается как вязкоупругий слой конечной толщины с собственными механическими свойствами. Модель Хоффа–Сонтюма–Ховема развивает этот подход, дополнительно учитывая вязкость оболочки и связанное с ней демпфирование радиальных колебаний. Эти модели широко применяются для описания микропузырьков с жёсткими, прежде всего полимерными, оболочками [115, 116, 126–130].

Модель Мармоттана

Для описания липидных микропузырьков Мармоттаном и соавторами предложена модель с радиус-зависимым поверхностным натяжением [118, 128, 131]:

$$\sigma(R) = \begin{cases} 0, & R \leq R_b, \\ \chi \left(\frac{R^2}{R_b^2} - 1 \right), & R_b < R < R_r, \\ \sigma_{ж}, & R \geq R_r, \end{cases} \quad (1.8)$$

где R_b – радиус, при котором начинается образование складок оболочки; R_r – радиус её разрыва; χ – поверхностная упругость оболочки; $\sigma_{ж}$ – поверхностное натяжение чистой жидкости.

Модель выделяет три состояния липидной оболочки: образование складок, упругое растяжение и разрыв. Это позволяет описывать нелинейное поведение липидных микропузырьков, включая генерацию гармоник, субгармоник и разрушение при высоких акустических давлениях [127, 128, 131–133].

Большинство существующих моделей разработано для липидных и полимерных оболочек и лишь частично применимо к белковым микропузырькам. Это связано с неоднородной структурой белковой оболочки, конформационными изменениями белка и изменением её механических свойств в процессе формирования и ультразвукового воздействия. Несмотря на попытки учесть эти особенности в математических моделях, описание белковых микропузырьков остаётся недостаточно разработанным [108, 124].

В целом существующие модели позволяют описывать влияние механических свойств оболочки на динамику микропузырьков. Вместе с тем математическое описание белковых оболочек остаётся одной из наименее разработанных областей, что определяет актуальность исследований, посвящённых взаимосвязи их структуры и акустических свойств [122, 124, 126, 127, 130].

1.3. Методы получения микропузырьков

1.3.1. Ультразвуковой метод получения микропузырьков

Ультразвуковой метод является одним из наиболее распространённых способов получения микропузырьков с липидными, белковыми, полимерными и композитными оболочками. Он основан на воздействии низкочастотного ультразвука высокой интенсивности на систему, содержащую жидкую и газовую фазы. При развитии ультразвуковой

кавитации происходят образование, рост и схлопывание газовых полостей, что сопровождается диспергированием газа и образованием большого числа микропузырьков в присутствии поверхностно-активных компонентов [134].

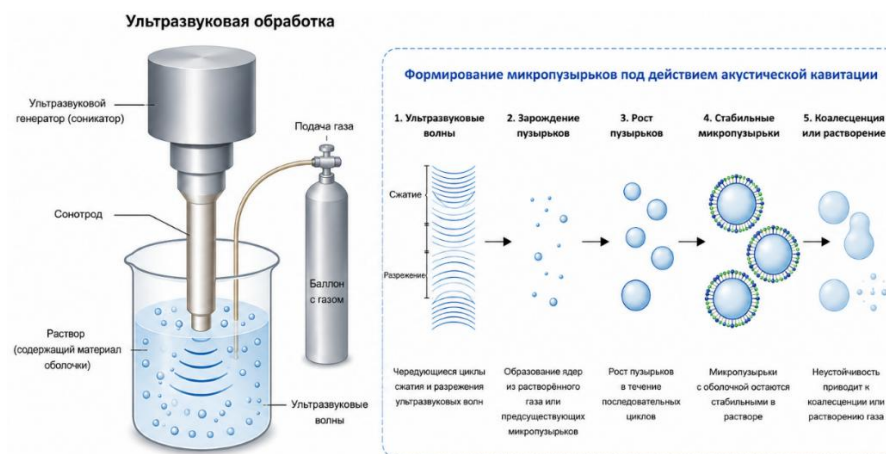


Рисунок 1.7. Схематическое изображение ультразвукового метода получения микропузырьков. Слева показана экспериментальная схема формирования микропузырьков при ультразвуковой обработке системы газ–жидкость, справа – основные стадии процесса, включающие воздействие ультразвуковых волн, зарождение и рост пузырьков, образование стабильных микропузырьков и возможные процессы коалесценции или растворения газа.

При ультразвуковом синтезе наконечник соноотрода обычно располагают вблизи или непосредственно на границе раздела газ–жидкость, где интенсивность ультразвуковой воздействия максимальна. Это обеспечивает эффективное диспергирование газа и образование большого числа микропузырьков, стабилизируемых липидами, белками, полимерами или другими поверхностно-активными веществами [103, 109]. Исторически именно ультразвуковой метод позволил получить первые микропузырьки, пригодные для использования в качестве контрастных агентов на основе микропузырьков [135]. В дальнейшем его адаптировали для получения микропузырьков с оболочками различного состава, включая белковые, полимерные и композитные [94, 109, 136, 137]. Свойства микропузырьков определяются условиями синтеза. Наиболее важными параметрами являются

частота и мощность ультразвука, продолжительность обработки, температура среды, положение соноэлектрода, состав газовой фазы и концентрация компонентов раствора. Для большинства белковых и липидных систем используют ультразвук с частотой около 20 кГц, мощностью от нескольких десятков до сотен ватт и продолжительностью обработки от нескольких секунд до нескольких минут. Изменение этих параметров позволяет регулировать размер, концентрацию, устойчивость и выход микропузырьков.

Ультразвуковой синтез представляет собой статистический процесс, обусловленный большим числом независимых кавитационных событий. Поэтому наряду с высокой производительностью его основным недостатком является широкое распределение микропузырьков по размерам. Это приводит к вариациям акустических свойств и может требовать дополнительной очистки или фракционирования [103, 104, 109].

Несмотря на развитие альтернативных технологий, ультразвуковой метод остаётся одним из наиболее распространённых способов получения микропузырьков благодаря простоте, высокой производительности и совместимости с различными материалами оболочки [5, 29, 94, 109].

1.3.2. Микрофлюидные методы получения микропузырьков

Микрофлюидные технологии обеспечивают высокий уровень контроля над процессом формирования микропузырьков. (рис. 1.8) Метод основан на управляемом взаимодействии потоков газа и жидкости в микроканалах при ламинарном режиме течения. В отличие от ультразвукового метода образование каждого пузырька происходит в контролируемых гидродинамических условиях, что обеспечивает высокую воспроизводимость процесса и узкое распределение микропузырьков по размерам [139–141].

Размер микропузырьков определяется геометрией микроканалов, соотношением расходов газовой и жидкой фаз, давлением газа, вязкостью и

поверхностным натяжением раствора, а также гидродинамическими параметрами течения, включая капиллярное число [139, 142].

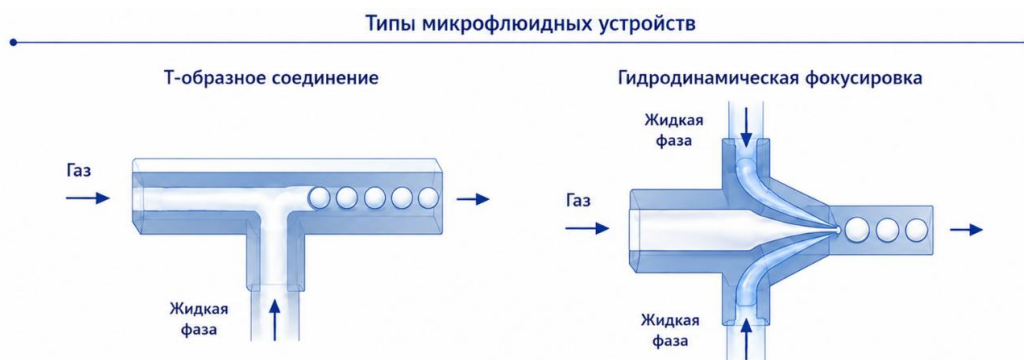


Рисунок 1.8. Схематическое изображение основных типов микрофлюидных устройств для получения микропузырьков (Т-образное соединение и гидродинамическая фокусировка).

Наиболее распространены устройства с Т-образным соединением каналов и гидродинамической фокусировкой потока. В первом случае газовый поток пересекается с потоком жидкости, вызывая последовательное образование пузырьков. Во втором газ подают через центральный канал, а жидкость — через боковые, где происходит сжатие газовой струи. Такая конструкция обеспечивает более точный контроль размеров микропузырьков и позволяет получать высокомономодисперсные системы [139–143].

Большинство устройств изготавливают из полидиметилсилоксана методом мягкой литографии, реже используют стеклянные или фторполимерные капилляры. Современные конструкции позволяют не только получать микропузырьки, но и модифицировать их оболочку непосредственно в процессе формирования [140, 142, 143].

Микрофлюидные методы совместимы с широким спектром материалов оболочки, включая белки, фосфолипиды, полисахариды и блок-сополимеры. В качестве газового ядра используют воздух, азот, гексафторид серы и перфторуглероды, причём последние обеспечивают более высокую

устойчивость микропузырьков благодаря низкой растворимости в воде [139–144].

В целом микрофлюидные технологии позволяют независимо регулировать размер микропузырьков, состав оболочки и газового ядра, получая высокомонодисперсные системы с воспроизводимыми свойствами. Их основными недостатками остаются сравнительно низкая производительность, сложность масштабирования и вероятность засорения микроканалов при работе с вязкими белковыми и полимерными растворами [29, 145].

1.3.3. Электрогидродинамические и мембранные методы формирования микропузырьков

Помимо ультразвукового метода и микрофлюидных технологий, для получения микропузырьков используют электрогидродинамические и мембранные методы, позволяющие получать сравнительно однородные дисперсии. (рис. 1.9)

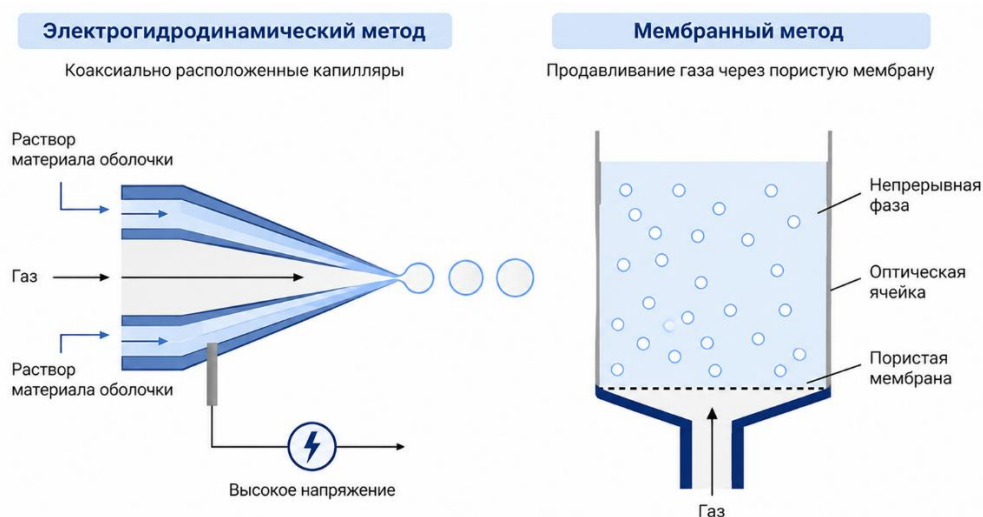


Рисунок 1.9. Схематическое изображение электрогидродинамического и мембранного методов формирования микропузырьков.

При электрогидродинамическом методе газ и раствор материала оболочки подают через коаксиальные капилляры, а образование

микропузырьков происходит под действием электрического поля высокого напряжения. Размер микропузырьков регулируют изменением расходов газовой и жидкой фаз и величины приложенного напряжения. Метод обеспечивает получение однородных микропузырьков и допускает включение функциональных компонентов непосредственно в процессе формирования оболочки, однако требует использования высокого напряжения, что усложняет аппаратную реализацию [103, 139, 146–148].

Мембранный метод основан на продавливании газа через пористую мембрану в раствор стабилизатора. Размер микропузырьков определяется диаметром пор, давлением газа, расходом жидкой фазы и скоростью адсорбции стабилизатора на границе раздела фаз. Использование пористых мембран позволяет получать сравнительно монодисперсные системы, тогда как отсутствие стабилизатора приводит к коалесценции и укрупнению микропузырьков [149].

В целом электрогидродинамические и мембранные методы обеспечивают хороший контроль процесса формирования микропузырьков и позволяют получать системы с узким распределением по размерам. Вместе с тем они пока уступают ультразвуковому методу и микрофлюидным технологиям по распространённости, что связано с необходимостью специализированного оборудования и сложностью масштабирования.

1.4. Белковые микропузырьки и белковые межфазные структуры

В отличие от липидных и большинства полимерных микропузырьков белковая оболочка не является заранее сформированной структурой. Она образуется непосредственно при адсорбции белковых макромолекул на границе раздела газ–жидкость и их последующей межфазной реорганизации. В результате формируется неоднородная гидратированная сеть, свойства которой определяются степенью конформационных изменений белка, плотностью межмолекулярных контактов и условиями окружающей среды.

Поэтому представление белкового микропузырька как частицы с однородной оболочкой является приближением и применимо главным образом при математическом моделировании.

1.4.1. Поверхностная активность белков и их структурная организация на границе газ–жидкость как природные поверхностно-активные макромолекулы

Большинство глобулярных белков являются амфифильными макромолекулами и способны самопроизвольно адсорбироваться на границе раздела газ–жидкость благодаря наличию гидрофильных и гидрофобных участков. (рис. 1.10) В отличие от низкомолекулярных поверхностно-активных веществ белки образуют межфазный слой конечной толщины с вязкоупругими свойствами и неоднородной структурой. Это обеспечивает стабилизацию микропузырьков, однако одновременно делает свойства белковой оболочки неравновесными и зависящими от времени [150, 151].

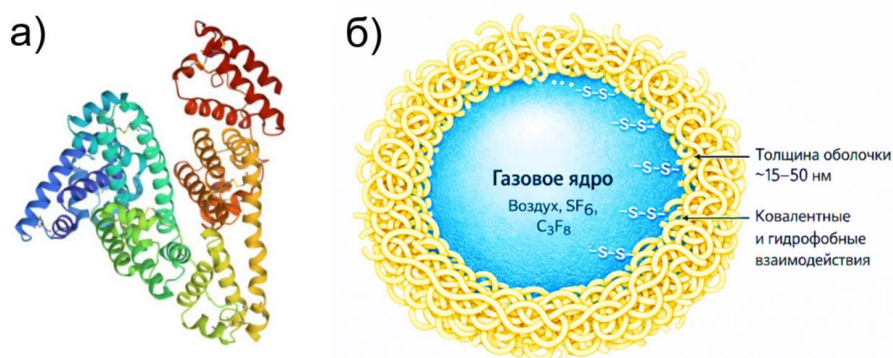


Рисунок 1.10. Структурные особенности белковых микропузырьков. а) Пространственная структура сывороточного альбумина – глобулярного белка с преобладанием α-спиральных участков и доменной организацией. б)

Схематическое представление белкового микропузырька.

Наиболее изученными белками для формирования оболочек микропузырьков являются человеческий и бычий сывороточные альбумины. Их широкое применение связано с высокой растворимостью, поверхностной активностью и наличием реакционноспособных аминокислотных остатков,

обеспечивающих стабилизацию межфазного слоя и возможность его дальнейшей модификации. Микропузырьки с оболочкой из человеческого сывороточного альбумина стали основой первых контрастных агентов на основе микропузырьков, внедрённых в клиническую практику: сначала Альбунекс с воздушным ядром, затем Оптисон с перфторпропаном (C_3F_8). Замена воздуха на малорастворимый перфторуглерод позволила уменьшить диффузионные потери газа и увеличить время циркуляции микропузырьков.

Человеческий сывороточный альбумин представляет собой глобулярный белок с преобладанием α -спиральной структуры. Бычий сывороточный альбумин близок к нему по аминокислотной последовательности и пространственной организации, поэтому широко используется в качестве модельного белка [109, 152]. Поведение альбумина на границе раздела газ–жидкость определяется его зарядом, распределением гидрофобных участков и способностью к образованию межмолекулярных взаимодействий.

Помимо альбумина, для формирования оболочек микропузырьков исследовали лизоцим, гемоглобин, фибриноген, стрептавидин и другие белки. Устойчивость и механические свойства микропузырьков существенно зависят от природы белка и организации межфазной сети. Так, для лизоцима показана более высокая устойчивость к механическому и ультразвуковому воздействию по сравнению с альбумином, что связывают с различиями в плотности упаковки белковых молекул и характере межмолекулярных взаимодействий [109, 150, 153].

Формирование белковой оболочки сопровождается конформационными изменениями белка. Межфазный слой включает нативные, частично изменённые и агрегированные молекулы, различно ориентированные относительно поверхности газового ядра. Такая структура формируется в результате адсорбции, частичной дегидратации, механических напряжений и образования межмолекулярных контактов [103, 108, 114].

При ультразвуковом получении микропузырьков возникают интенсивные сдвиговые деформации, локальные изменения температуры и высокие градиенты давления. Это способствует частичному разворачиванию белковых молекул, выходу гидрофобных участков на поверхность и усилению межбелковых взаимодействий, приводящих к формированию межфазной сети [104, 154].

Формирование белковой оболочки не следует связывать исключительно с образованием дисульфидных связей. Существенный вклад в её стабилизацию вносят гидрофобные, электростатические, ван-дер-ваальсовы и водородные взаимодействия, тогда как роль дисульфидных связей зависит от природы белка и условий получения [108, 109].

В целом белковая оболочка формируется не вследствие полной денатурации белка, а в результате его частичных конформационных изменений и образования вязкоупругой межфазной сети. Её свойства определяются природой белка, условиями адсорбции, характером межмолекулярных взаимодействий и степенью сохранения исходной пространственной структуры. Это определяет необходимость исследования взаимосвязи между конформационным состоянием белка, строением оболочки и физико-химическими и акустическими свойствами микропузырьков [20, 109, 114].

1.4.2. Перестройка вторичной структуры белка и её роль в свойствах оболочки

Вторичная структура белка включает α -спирали, β -структуры и неупорядоченные участки, стабилизированные преимущественно водородными связями. (рис. 1.11) Для сывороточного альбумина в нативном состоянии характерно преобладание α -спиральной структуры, обеспечивающей его компактную глобулярную организацию [152].

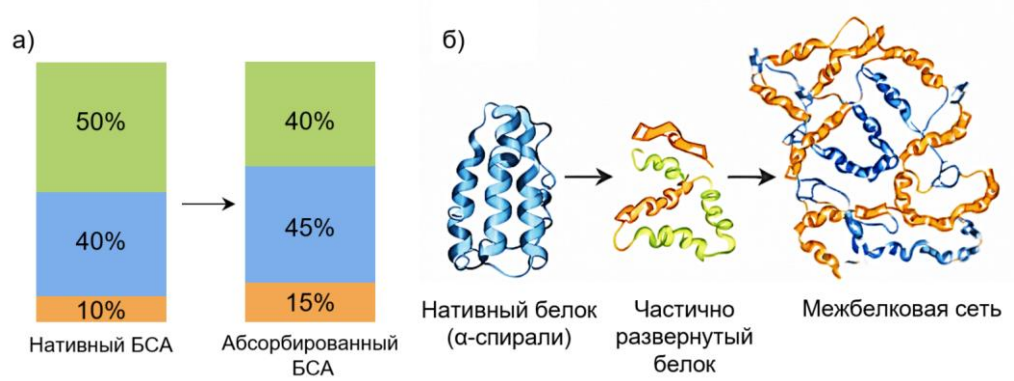


Рисунок 1.11. Перестройка вторичной структуры сывороточного альбумина при адсорбции на межфазной границе. а) Один из возможных вариантов изменения доли элементов вторичной структуры БСА при переходе от нативного состояния в растворе к адсорбированному состоянию. б) Схематическое представление частичной развёртки белковой молекулы и формирования межбелковой сети в оболочке.

При адсорбции белка на границе раздела газ–жидкость и формировании белковых микропузырьков под действием ультразвука происходят конформационные изменения, сопровождающиеся уменьшением содержания α -спиралей и увеличением доли β -структур и неупорядоченных участков. Эти изменения регистрируются методами инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье и кругового дихроизма и свидетельствуют о частичном изменении пространственной организации белка, способствующем усилению межмолекулярных взаимодействий и формированию межфазной сети [109, 155].

Уменьшение содержания α -спиралей не следует интерпретировать как полную денатурацию белка. Как правило, наблюдаются лишь частичные конформационные изменения, при которых сохраняется значительная часть исходной пространственной организации. Это способствует образованию гидрофобных, водородных, электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий между молекулами белка и формированию вязкоупругой оболочки микропузырька [103, 109, 114].

При ультразвуковом воздействии локальные сдвиговые напряжения, кратковременные повышения температуры и высокие градиенты давления, возникающие при ультразвуковой кавитации, могут вызывать частичное разворачивание полипептидных цепей, выход гидрофобных участков на поверхность и усиление межбелковых взаимодействий. Степень этих изменений зависит от природы белка и условий получения микропузырьков [104, 154].

По данным просвечивающей электронной и атомно-силовой микроскопии толщина белковой оболочки обычно составляет 10–50 нм. При этом её механические свойства определяются не столько толщиной слоя, сколько степенью конформационных изменений белка, плотностью упаковки молекул и характером межмолекулярных взаимодействий. Основной вклад в формирование вязкоупругой оболочки вносят гидрофобные, водородные, электростатические и ван-дер-ваальсовы взаимодействия, тогда как роль ковалентных связей зависит от природы белка и условий получения [103, 109, 113, 156].

Таким образом, вязкоупругие свойства белковой оболочки определяются совокупностью конформационных изменений и межмолекулярных взаимодействий, возникающих при адсорбции белка на границе раздела фаз. От степени сохранения нативной структуры, характера её изменений и организации межбелковой сети зависят устойчивость микропузырьков и их физико-химические и акустические свойства.

1.4.3. Влияние условий среды на устойчивость белковых микропузырьков и подходы к её повышению

Конформационное состояние белков и свойства формируемой ими оболочки зависят от условий среды. рН один из основных факторов, определяющий заряд аминокислотных остатков и соотношение электростатических, гидрофобных и водородных взаимодействий. (рис. 1.12)

Для сывороточного альбумина, изоэлектрическая точка которого находится в диапазоне рН 4,7–5,3, показано, что при приближении к ней усиливаются агрегация белка и уплотнение межфазного слоя, тогда как при удалении возрастает электростатическое отталкивание между молекулами и снижается плотность упаковки белковой сети.

Важную роль играет и ионная сила раствора. Изменение концентрации электролитов приводит к экранированию зарядов белковых молекул, изменению толщины двойного электрического слоя и соотношения электростатических и гидрофобных взаимодействий, что влияет на структуру и механические свойства межфазной оболочки [109, 157].

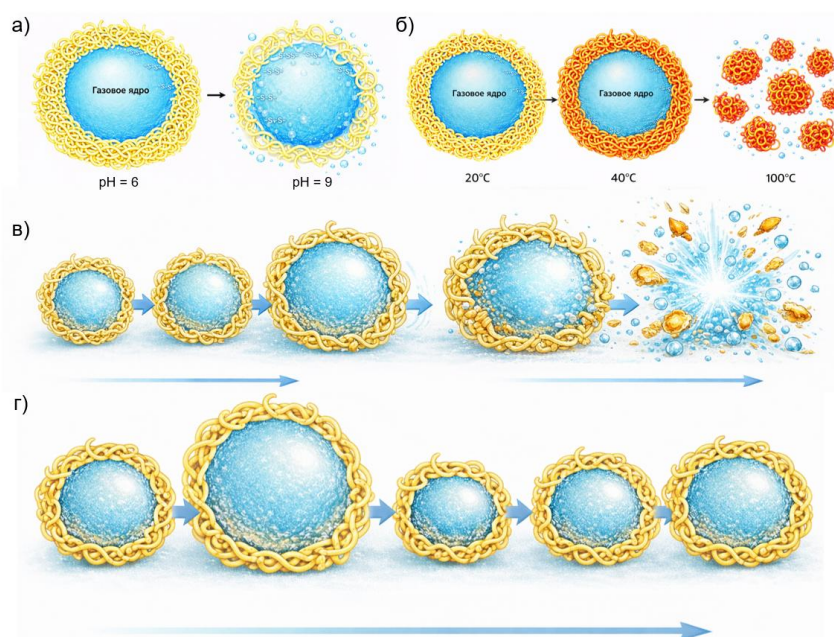


Рисунок 1.12. Схематическое представление влияния внешних факторов на структуру белковой оболочки микропузырьков на основе альбумина и их динамическое поведение: а) влияние рН на организацию межфазной сети; б) влияние температуры; в) разрушение оболочки при инерциальной кавитации; г) обратимые радиальные колебания микропузырька при диагностических режимах ультразвука.

Температура также влияет на устойчивость белковых микропузырьков (рис. 1.12б). Умеренный нагрев способствует частичным конформационным

изменениям белка, усилению гидрофобных взаимодействий и уплотнению межфазной сети, тогда как дальнейшее повышение температуры приводит к необратимой денатурации, разрушению оболочки и снижению её механической прочности [109, 156].

На устойчивость микропузырьков влияет и состав газового ядра. Использование малорастворимых перфторуглеродов и гексафторида серы уменьшает скорость диффузионного выхода газа и увеличивает время существования микропузырьков по сравнению с воздухом, продлевая время контрастирования [20, 109].

Ультразвуковое воздействие также изменяет свойства белковой оболочки. При диагностических уровнях акустического давления преобладают обратимые радиальные колебания микропузырьков, тогда как при более высоких интенсивностях развиваются процессы ультразвуковой кавитации. Это может сопровождаться частичным разворачиванием белковых молекул, усилением межбелковых взаимодействий, образованием β -структур и изменением вязкоупругих свойств оболочки. Вклад отдельных механизмов определяется режимом ультразвукового воздействия и составом системы [20, 104, 154]. Даже без разрушения микропузырьков многократные циклы воздействия способны вызывать постепенное накопление структурных изменений, проявляющееся уменьшением амплитуды колебаний и ускорением последующей дегазации [103, 104].

Основными причинами деградации белковых микропузырьков являются диффузионный выход газа, продолжающиеся конформационные изменения белковой оболочки и её механическое разрушение при многократных циклах деформации. Для альбуминовых микропузырьков описан двухстадийный механизм, включающий потерю газового ядра с последующим распадом оболочки и образованием белковых агрегатов [109, 158].

Для повышения устойчивости используют химическое сшивание белковой оболочки, модификацию поверхности гидрофильными полимерами и создание белково-полимерных композитных оболочек. Эти подходы позволяют повысить механическую прочность, уменьшить газопроницаемость и увеличить время существования микропузырьков. Вместе с тем увеличение жёсткости оболочки и изменение её вязкоупругих свойств могут снижать выраженность нелинейного акустического поведения [103, 109, 114, 150, 156, 159].

В целом повышение устойчивости белковых микропузырьков требует поиска баланса между стабильностью оболочки и её акустическими свойствами. Именно поэтому влияние белково-полимерных комплексов на конформационное состояние белка, строение межфазной оболочки и свойства микропузырьков остаётся одной из актуальных задач исследований [20, 109, 114].

1.4.4. Биосовместимость, иммунное распознавание и белковая корона белковых микропузырьков

Белковые микропузырьки характеризуются высокой биосовместимостью благодаря биологическому происхождению материала оболочки, возможности его ферментативной деградации и отсутствию токсичных продуктов распада при корректно подобранных условиях получения. Вместе с тем биосовместимость определяется не только природой белка, но и его конформационным состоянием. Белковая оболочка представляет собой межфазную сеть, включающую нативные, частично изменённые и агрегированные молекулы. Умеренные конформационные изменения способствуют её стабилизации, тогда как чрезмерное нарушение пространственной структуры белка может сопровождаться выходом на поверхность ранее скрытых участков молекулы, усиливающих иммунное распознавание и изменяющих клеточный ответ [109, 114, 160, 161].

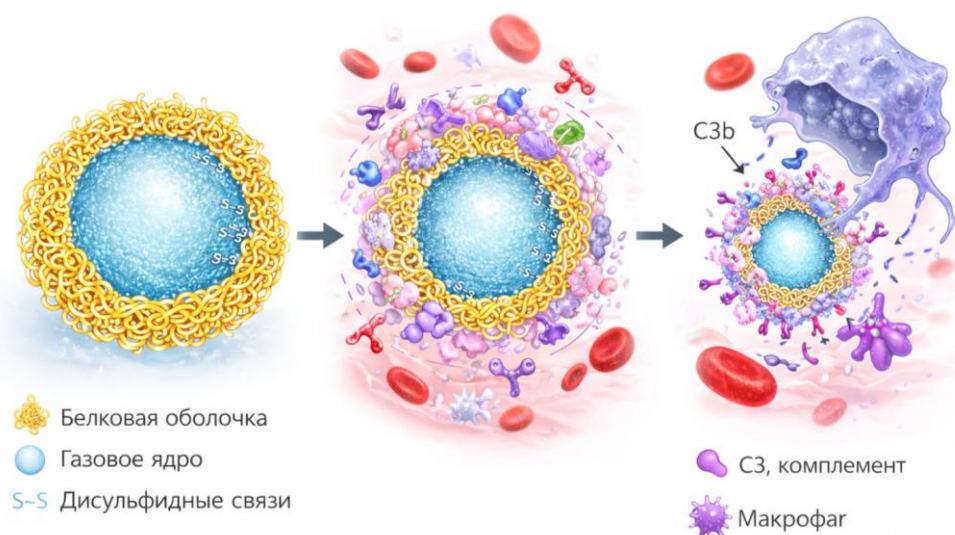


Рисунок 1.13. Схематичное изображение образования белковой короны после введения микропузырьков в кровоток.

Клиническое применение препаратов Albunex® и Optison™, представляющих собой контрастные агенты на основе микропузырьков с альбуминовой оболочкой, подтвердило возможность их безопасного внутрисосудистого использования в кардиологии, сосудистой и общей ультразвуковой диагностике [20, 109, 162].

После попадания в кровоток поверхность микропузырьков быстро взаимодействует с компонентами плазмы крови (рис. 1.13). На ней адсорбируются альбумин, иммуноглобулины, аполипопротеины, компоненты системы комплемента и другие белки, формируя белковую корону. Хотя это явление наиболее подробно изучено для наночастиц, оно характерно и для ультразвуковых микропузырьков [160, 162–170].

Образование белковой короны изменяет свойства поверхности микропузырьков, их коллоидную устойчивость, взаимодействие с клетками крови и эндотелием, а также распознавание клетками мононуклеарной фагоцитарной системы. Поэтому биологические свойства микропузырьков определяются не только составом исходной оболочки, но и её изменениями после контакта с биологическими жидкостями [20, 160, 161, 165–170].

В целом биологические свойства белковых микропузырьков определяются составом и строением оболочки, её конформационными изменениями и процессами, происходящими после попадания в кровоток. Эти факторы необходимо учитывать при разработке новых контрастных агентов на основе белковых и белково-композитных микропузырьков для диагностического и терапевтического применения.

1.5 Амфифильные полимеры: самоорганизация, архитектура и межфазные свойства

1.5.1. Амфифильные полимеры и их межфазная активность

Амфифильные полимеры содержат гидрофильные и гидрофобные фрагменты, что определяет их способность к самоорганизации и адсорбции на границе раздела фаз. В водной среде они образуют мицеллы, везикулы, частицы типа «ядро–оболочка» и другие надмолекулярные структуры, морфология которых зависит от соотношения взаимодействий между сегментами различной полярности [171–174]. (рис. 1.14)

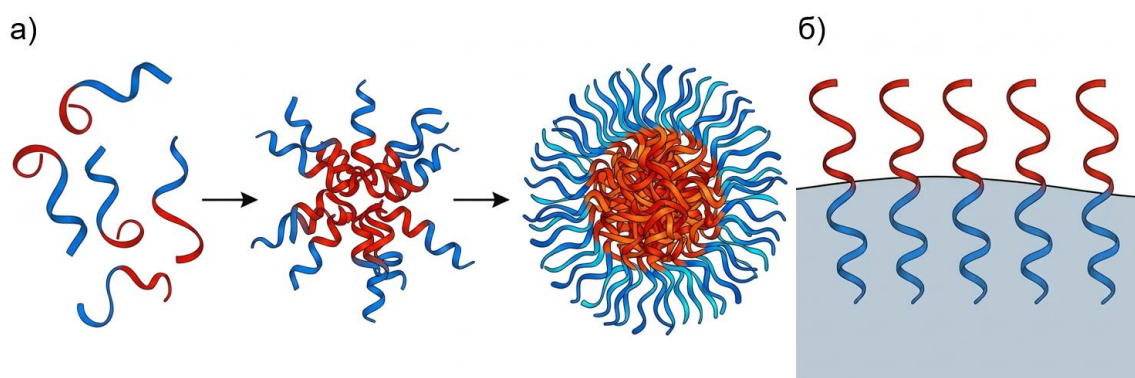


Рисунок 1.14. Самоорганизация амфифильных полимеров и их поведение на межфазной границе: а) формирование мицеллярных структур в водном растворе; б) ориентация амфифильных макромолекул на границе газ–жидкость.

Основной движущей силой самоорганизации является гидрофобный эффект. Ассоциация неполярных сегментов уменьшает их контакт с водой, что приводит к образованию агрегатов с гидрофобным ядром и гидратированной

оболочкой. Их размеры и устойчивость определяются гидрофобными взаимодействиями, межфазной энергией, конформационной энтропией и стерическими ограничениями [173, 175–177]. Дополнительный вклад в самоорганизацию вносят водородные, электростатические и другие нековалентные взаимодействия, зависящие от химического строения полимера и условий среды (рН, температуры, ионной силы и состава растворителя) [178–182].

Самоорганизация начинается при достижении критической концентрации агрегации. По сравнению с низкомолекулярными поверхностно-активными веществами амфифильные полимеры обычно имеют более низкую критическую концентрацию агрегации и образуют более устойчивые структуры благодаря кооперативному взаимодействию нескольких гидрофобных участков одной макромолекулы [171–173].

Амфифильные полимеры активно адсорбируются на границе раздела фаз. Гидрофобные фрагменты ориентируются в сторону неполярной фазы, а гидрофильные остаются в водной среде, снижая межфазное натяжение и формируя устойчивый адсорбционный слой. Благодаря большой длине цепей полимерные молекулы закрепляются на поверхности сразу несколькими участками, образуя более толстые и вязкоупругие межфазные слои по сравнению с низкомолекулярными поверхностно-активными веществами [183, 184]. Выраженность межфазной активности определяется химическим строением полимера, молекулярной массой, гидрофильно-гидрофобным балансом, природой функциональных групп и условиями среды. Изменение этих параметров позволяет регулировать процессы самоорганизации, свойства межфазных слоёв и устойчивость дисперсных систем [176, 178, 184, 185].

В целом способность амфифильных полимеров к самоорганизации и высокая межфазная активность определяют их широкое применение для стабилизации дисперсных систем и создания функциональных

биомедицинских материалов. Влияние архитектуры макромолекулы на эти процессы рассмотрено в следующем подразделе.

Архитектура макромолекулы определяет процессы самоорганизации амфифильных полимеров. Даже при одинаковом химическом составе изменение распределения гидрофильных и гидрофобных сегментов влияет на размеры, морфологию, устойчивость и кинетику формирования надмолекулярных структур. В отличие от низкомолекулярных поверхностно-активных веществ свойства амфифильных полимеров зависят также от длины цепей, последовательности звеньев, числа блоков, характера ветвления и топологии макромолекулы, что позволяет направленно регулировать процессы самоорганизации и свойства образующихся систем [172, 173, 176–178].

Наиболее изученным классом амфифильных макромолекул являются блок-сополимеры, состоящие из чередующихся гидрофильных и гидрофобных блоков. Пространственное разделение сегментов различной полярности обеспечивает их самоорганизацию в селективных растворителях с образованием мицелл, полимеросом, цилиндрических агрегатов и других надмолекулярных структур. Морфология агрегатов определяется химической природой блоков, их относительной длиной, молекулярной массой, числом блоков и степенью асимметрии макромолекулы [171–173, 176].

Для диблочных сополимеров увеличение доли гидрофобного блока сопровождается ростом размеров гидрофобного ядра и уменьшением кривизны межфазной границы, что способствует переходу от сферических мицелл к цилиндрическим структурам, везикулам и полимеросомам. Напротив, увеличение содержания гидрофильных сегментов приводит к формированию более компактных сферических агрегатов с высокой коллоидной устойчивостью. Одновременно изменяются критическая концентрация агрегации, динамика обмена полимерных цепей между мицеллами и способность к инкапсуляции гидрофобных соединений [171, 177,

186]. Число блоков существенно влияет на самоорганизацию, из-за чего даже при сохранении общего химического состава изменение последовательности гидрофильных и гидрофобных сегментов изменяет термодинамику самосборки, размеры агрегатов и их внутреннюю организацию. Для мультиблочных амфифильных сополимеров увеличение числа блоков способствует образованию более компактных структур, изменению упаковки цепей и повышению кинетической стабильности агрегатов, что объясняется увеличением числа межблочных границ и усложнением конформационной организации макромолекул [176, 177, 187].

Сходные закономерности установлены для биоразлагаемых мультиблочных систем на основе полиэтиленоксида, полипропиленоксида и полилактида, применяемых в качестве носителей лекарственных веществ. Изменение длины отдельных блоков и их взаимного расположения позволяет регулировать критическую концентрацию агрегации, размеры мицелл, скорость высвобождения инкапсулированных соединений и взаимодействие агрегатов с клетками. При этом свойства системы определяются не только химическим составом, но и архитектурой макромолекулы, влияющей на упаковку гидрофобного ядра и структуру гидрофильной короны [171, 173, 188, 189].

Последовательность расположения мономерных звеньев также влияет на самоорганизацию амфифильных полимеров. Даже при неизменном соотношении гидрофильных и гидрофобных компонентов изменение их распределения вдоль цепи приводит к изменению механизма сворачивания макромолекулы, кинетики формирования агрегатов и их морфологии. Регулярное чередование звеньев способствует образованию более однородных и воспроизводимых структур, тогда как статистическое распределение увеличивает разнообразие конформационных состояний и расширяет диапазон возможных морфологий [176, 177, 190].

Топология макромолекулы также влияет на процессы самоорганизации. Помимо линейных широко изучаются звездообразные, циклические, гребнеобразные, гиперразветвлённые и дендритные амфифильные полимеры. Изменение топологии приводит к перераспределению гидрофобных доменов, изменению плотности упаковки цепей и кривизны межфазной поверхности, вследствие чего полимеры одинакового химического состава способны формировать агрегаты различной морфологии и устойчивости. Таким образом, топология является самостоятельным параметром, позволяющим регулировать свойства самоорганизующихся систем независимо от химической природы мономеров [184, 190].

Наряду с блок-сополимерами важный класс амфифильных систем составляют привитые сополимеры, в которых гидрофильные или гидрофобные боковые цепи ковалентно присоединены к основной макромолекуле. Такая архитектура позволяет регулировать плотность прививки, длину боковых цепей и гибкость основного остова, изменяя размеры, морфологию и устойчивость самоорганизованных структур. Увеличение плотности прививки способствует формированию более компактных и упорядоченных агрегатов, тогда как изменение гибкости основной цепи определяет эффективность упаковки гидрофобных доменов и кинетику самоорганизации [184, 191, 192]. Особую группу составляют щёточные и гребнеобразные сополимеры, характеризующиеся высокой плотностью боковых цепей. Пространственное разделение боковых фрагментов приводит к увеличению жёсткости макромолекулы, уменьшению перепутывания цепей и изменению упаковки гидрофобных сегментов. Такие полимеры формируют более однородные и коллоидно устойчивые агрегаты по сравнению с линейными аналогами [191, 193].

Статистические амфифильные сополимеры, несмотря на отсутствие выраженного разделения гидрофильных и гидрофобных блоков, также способны к самоорганизации. Их поведение определяется локальной

ассоциацией гидрофобных участков и внутримолекулярным сворачиванием цепей с образованием одиночных полимерных наночастиц, которые могут служить центрами дальнейшей межмолекулярной ассоциации [174].

Аналогичные закономерности установлены и для амфифильных производных N-винил-2-пирролидона. Введение гидрофобных концевых или боковых групп изменяет характер самоорганизации макромолекул, тогда как молекулярная масса, строение гидрофобных фрагментов и наличие функциональных звеньев определяют размеры, морфологию, устойчивость и способность агрегатов к инкапсуляции гидрофобных соединений [194–196].

Влияние архитектуры на морфологию агрегатов часто описывают с использованием параметра упаковки p . При $p \leq 1/3$ преимущественно формируются сферические мицеллы, при $1/3 < p \leq 1/2$ – цилиндрические агрегаты, при $1/2 < p \leq 1$ – везикулы и билипидоподобные структуры, тогда как при $p > 1$ возможно образование обратных мицелл. Однако морфология определяется не только параметром упаковки, но и гибкостью цепей, топологией макромолекулы, кинетикой самоорганизации и характером нековалентных взаимодействий [171, 173].

Таким образом, изменение архитектуры амфифильного полимера позволяет управлять размерами, морфологией и устойчивостью самоорганизованных структур, что лежит в основе рационального молекулярного дизайна функциональных полимерных материалов.

1.5.3. Гидрофильные полимеры в амфифильных системах: полиэтиленгликоль и его альтернативы

Как показано в разделе 1.5.2, свойства амфифильных сополимеров во многом зависят от природы гидрофильного блока. Он обеспечивает взаимодействие с водной средой, устойчивость коллоидных систем и влияет на биологические свойства образующихся структур. Наиболее распространённым гидрофильным компонентом таких систем является

полиэтиленгликоль (ПЭГ). (рис. 1.15) ПЭГ представляет собой гидрофильный неионный полимер и сам по себе не обладает амфифильными свойствами. Однако в составе блок-сополимеров и привитых сополимеров, например ПЭГ–ПЛА и ПЭГ–ПКЛ, он образует гидрофильную оболочку мицелл, везикул и других надмолекулярных структур. Такая оболочка повышает их устойчивость в водной среде и определяет свойства границы раздела фаз [178, 181, 198–200].

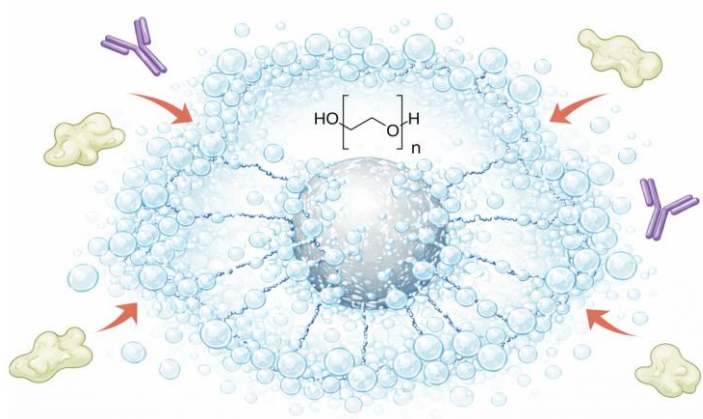


Рисунок 1.15. Стерическое экранирование поверхности частицы ПЭГ и ингибирование неспецифического связывания белков и антител.

Основной функцией ПЭГ является образование плотного гидратированного слоя на поверхности частиц. Благодаря высокой подвижности полимерных цепей и способности связывать большое количество молекул воды формируется стерический барьер, препятствующий агрегации частиц, адсорбции белков плазмы и неспецифическим межмолекулярным взаимодействиям. В результате уменьшается образование белковой короны, снижается захват частиц клетками мононуклеарной фагоцитарной системы и увеличивается время их циркуляции в кровотоке. Эффективность такой защиты определяется молекулярной массой ПЭГ, плотностью прививки и конформацией полимерных цепей на поверхности частиц [180, 181, 199–203].

Широкое применение ПЭГ связано также с его высокой биосовместимостью, отсутствием заряда, химической инертностью и возможностью получения блок-сополимеров с биоразлагаемыми полиэфирами, такими как полилактид, полигликолид и поликапролактон. Благодаря этим свойствам ПЭГ-содержащие амфифильные сополимеры широко применяются в системах доставки лекарственных веществ, тканевой инженерии и при создании функциональных наноматериалов [199, 200].

Несмотря на перечисленные преимущества, в последние годы были выявлены и ограничения применения ПЭГ. Наиболее значимыми из них являются образование антител к ПЭГ, ускоренное выведение частиц при повторном введении, активация системы комплемента и развитие реакций гиперчувствительности. Эти явления снижают эффективность лекарственных препаратов и ограничивают возможность их многократного применения. В связи с этим поиск новых гидрофильных компонентов для амфифильных систем стал одним из наиболее активно развивающихся направлений современной химии полимеров [180, 181, 199, 200, 204–206].

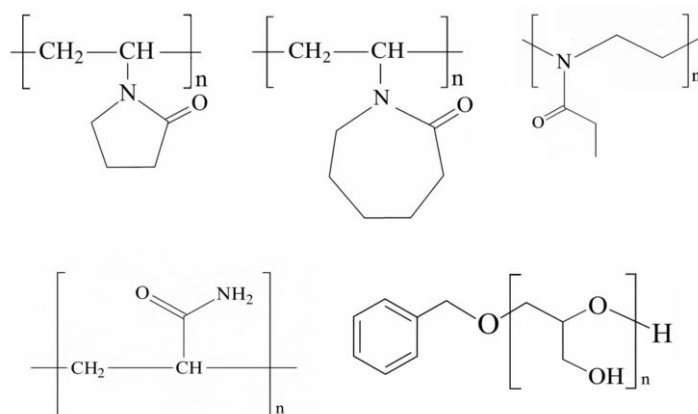


Рисунок 1.16. Структурные формулы гидрофильных полимеров, рассматриваемых в качестве альтернатив полиэтиленгликолю: поли-N-винилпирролидон, поли-N-винилкапролактон, поли(2-оксазолин), полиакриламид и поли(глицерол).

В связи с выявленными ограничениями ПЭГ активно исследуются другие гидрофильные полимеры, способные обеспечивать стерическую стабилизацию дисперсных систем. Основными требованиями к таким материалам являются высокая растворимость в воде, низкая адсорбция белков, биосовместимость, отсутствие выраженной иммуногенности и возможность химической модификации. Наиболее изученными альтернативами являются полиглицерол, поли(2-оксазолины), полиакриламид и поли(N-винилпирролидон) [205–207] (рис. 1.16).

Полиглицерол характеризуется высокой плотностью гидроксильных групп и выраженной способностью к гидратации. Его линейные и гиперразветвлённые производные формируют плотный гидратированный слой, препятствующий неспецифической адсорбции белков и агрегации частиц. Для поверхностей и наноструктур, модифицированных полиглицеролом, показаны низкая адсорбция белков, высокая гемосовместимость и низкая цитотоксичность, что позволяет рассматривать его как одну из наиболее перспективных альтернатив ПЭГ [199, 205].

Поли(2-оксазолины) представляют собой водорастворимые полимеры, свойства которых регулируются строением боковых заместителей, молекулярной массой и архитектурой макромолекулы. Они используются в составе амфифильных сополимеров и систем доставки лекарственных веществ, а контролируемый синтез позволяет получать макромолекулы с заданной длиной цепи, функциональными группами и требуемыми гидрофильными свойствами [199, 207–209].

Полиакриламид также обладает высокой гидрофильностью и обеспечивает стерическую стабилизацию липосом и других дисперсных систем, уменьшая агрегацию частиц и увеличивая продолжительность их циркуляции. Однако его применение в биомедицинских системах ограничено возможным присутствием остаточного акриламида, сложностью полного контроля состава и риском развития воспалительных реакций. Поэтому

полиакриламид рассматривается преимущественно как специализированный материал, а не как универсальная замена ПЭГ [205, 206].

Особое место среди гидрофильных полимеров занимает поли(N-винилпирролидон). Его высокая растворимость в воде обусловлена наличием полярных лактамных групп, способных образовывать водородные связи и участвовать в дипольных взаимодействиях. Благодаря биосовместимости, химической устойчивости и возможности химической модификации ПВП широко применяется в фармацевтических и биомедицинских системах как стабилизатор, связующее вещество, солюбилизатор и компонент полимерных носителей [210–212].

В отличие от ПЭГ, выполняющего главным образом функцию гидрофильного экранирования, ПВП способен к более выраженному взаимодействию с белками, лекарственными веществами и неорганическими частицами. Карбонильная группа лактамного цикла участвует в образовании водородных связей и координационных взаимодействий, что способствует стабилизации дисперсий, уменьшению агрегации наночастиц и образованию полимерных комплексов [163, 213].

Биологические свойства ПВП зависят от его молекулярной массы. Низкомолекулярные фракции преимущественно выводятся через почки, тогда как увеличение длины цепи замедляет выведение и изменяет распределение полимера в организме. Поэтому при разработке биомедицинских систем необходимо учитывать не только химическое строение, но и молекулярную массу ПВП [196].

Введение гидрофобных концевых или боковых групп придаёт ПВП амфифильные свойства и обеспечивает его самоорганизацию в воде с образованием наноразмерных агрегатов, имеющих гидрофобную внутреннюю область и гидратированную оболочку. Их размеры, устойчивость и способность включать гидрофобные вещества определяются молекулярной

массой полимера, природой гидрофобных групп и наличием дополнительных функциональных звеньев [195–197, 214, 215]. Для таких амфифильных производных показана возможность получения устойчивых наночастиц, совместимых с компонентами крови и обладающих низкой цитотоксичностью в определённом диапазоне концентраций. Наличие карбоксильных или аминных групп позволяет регулировать взаимодействие таких систем с белками и другими биомолекулами [196, 213, 216].

Следовательно, ни один из рассмотренных гидрофильных полимеров не является универсальной заменой ПЭГ. Выбор конкретного материала определяется требуемой степенью гидратации, устойчивостью к адсорбции белков, молекулярной массой, возможностью химической модификации и характером взаимодействия с биологическими компонентами. Среди альтернатив ПЭГ особый интерес представляют полимеры на основе N-винилпирролидона благодаря сочетанию гидрофильности, способности к комплексообразованию, коллоидной стабилизации и возможности направленной химической модификации. Эти свойства делают их перспективными компонентами амфифильных и белково-полимерных систем.

1.6. Белково-полимерные комплексы как межфазные системы: формирование, структура и функциональные свойства

Белково-полимерные комплексы представляют собой самостоятельный класс надмолекулярных систем, свойства которых определяются совместной организацией белковых и полимерных макромолекул. В отличие от отдельных компонентов они обладают новыми структурными, коллоидными и функциональными свойствами, возникающими вследствие кооперативного действия различных типов межмолекулярных взаимодействий. В зависимости от природы белка, строения полимера и условий среды могут формироваться растворимые комплексы, наночастицы, комплексные мицеллы, коацерватные фазы, сетчатые агрегаты и ковалентные конъюгаты. Их морфология, размеры и устойчивость зависят не только от химического состава компонентов, но и

от архитектуры, молекулярной массы, заряда и гидрофобности полимерной цепи, а также пространственной организации белковой поверхности [6, 178, 179, 181]. Изменение рН, ионной силы, температуры, концентрации компонентов и их стехиометрического соотношения сопровождается перестройкой структуры комплекса, изменением его размеров, растворимости и устойчивости. Поэтому образование комплекса представляет собой динамический процесс, определяемый термодинамическим балансом межмолекулярных взаимодействий и конформационной подвижностью обеих макромолекул. Эти закономерности лежат в основе направленного создания функциональных белково-полимерных материалов для биомедицинских применений [178, 179].

1.6.1. Формирование и структурная организация белково-полимерных комплексов: роль молекулярных параметров и условий среды

Формирование белково-полимерных комплексов представляет собой процесс самопроизвольной ассоциации белковых макромолекул с синтетическими или природными полимерами. (рис. 1.17) В зависимости от химической природы компонентов, архитектуры полимерной цепи и условий среды могут образовываться растворимые комплексы, наночастицы, полиэлектролитные комплексные мицеллы, коацерваты, сетчатые агрегаты и другие иерархически организованные структуры. Тип формирующегося комплекса зависит от баланса электростатических, гидрофобных и других нековалентных взаимодействий, а также молекулярных характеристик компонентов [181, 182].

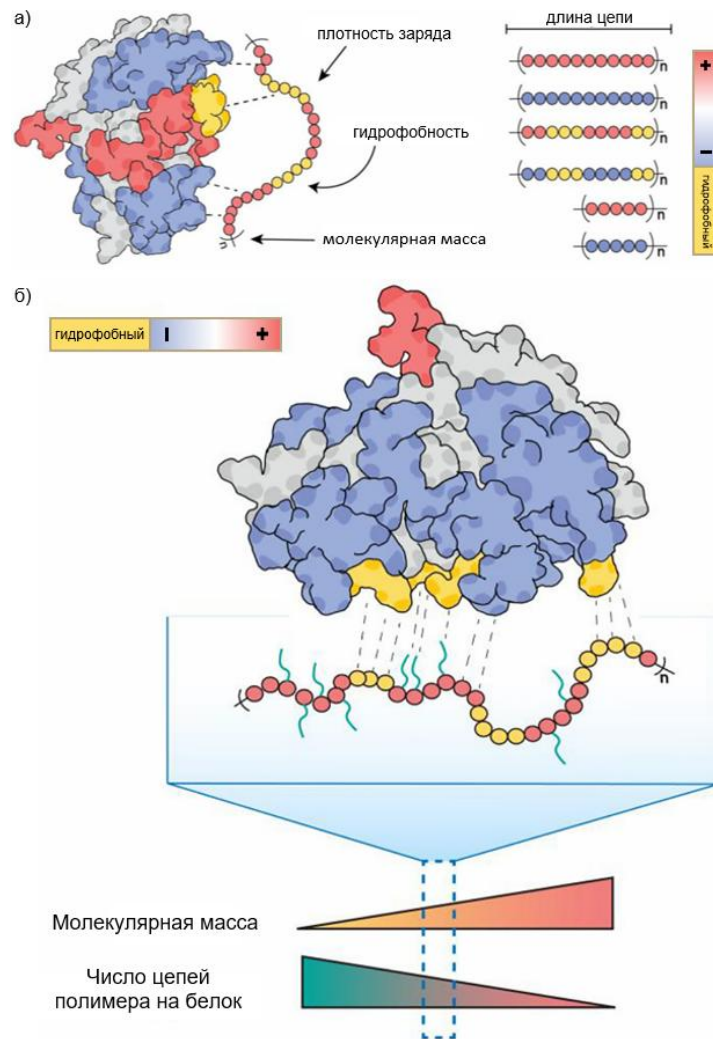


Рисунок 1.17. Схематическое представление факторов, определяющих образование и структурную организацию белково-полимерных комплексов.

а) Основные параметры, определяющие комплексообразование: молекулярная масса и архитектура полимера, плотность заряда, гидрофобность полимерной цепи, а также гетерогенность поверхности белка, включающая локальные участки различного заряда и гидрофобности. б)

Схема формирования белково-полимерного комплекса в растворе.

Ключевую роль в комплексообразовании играет совокупность межмолекулярных взаимодействий. Наряду с электростатическим притяжением существенный вклад вносят водородные связи, гидрофобные, диполь-дипольные и ван-дер-ваальсовы взаимодействия, а также энтропийный выигрыш, обусловленный высвобождением противоионов и молекул воды из гидратных оболочек взаимодействующих макромолекул.

Современные термодинамические модели показывают, что устойчивость комплекса определяется их кооперативным действием, которое зависит от состава системы и внешних условий [178, 179, 185].

Одним из ключевых факторов является соотношение рН среды и изоэлектрической точки белка. Изменение кислотности сопровождается перераспределением заряда на поверхности белка и степени ионизации функциональных групп полимера, что непосредственно влияет на силу их взаимодействия. Для системы бычий сывороточный альбумин–полиакриловая кислота показано, что устойчивые комплексы преимущественно формируются при рН, близком к изоэлектрической точке белка, тогда как при физиологическом рН взаимодействие ослабевает вследствие преобладания электростатического отталкивания. Существенное влияние также оказывают молекулярная масса полиэлектролита, степень его ионизации и стехиометрическое соотношение компонентов [180, 182].

Современные исследования показывают, что представление белковой молекулы в виде равномерно заряженной сферы является упрощением. Поверхность глобулярных белков химически неоднородна и содержит локальные участки с различным зарядом, гидрофобностью и полярностью (рисунок 1.17а). Благодаря существованию таких «зарядовых пятен» взаимодействие белка с полиэлектролитом возможно даже при одинаковом знаке их суммарного заряда. В этом случае связывание обеспечивается локальными комплементарными участками поверхности, эффектом регуляции заряда и перераспределением протонов между функциональными группами белка и полимера. Кроме того, эффективность образования комплекса определяется не только величиной суммарного заряда, но и его пространственным распределением, плотностью заряда полимерной цепи, её гибкостью и доступностью гидрофобных доменов белка [178, 179, 184].

Гидратация взаимодействующих макромолекул также играет важную роль в термодинамике комплексообразования. При образовании комплекса происходит частичное разрушение гидратных оболочек белка и полимера,

сопровожающееся высвобождением связанных молекул воды и противоионов (рисунок 1.176). Это приводит к увеличению энтропии системы и является одним из основных факторов стабилизации белково-полимерных комплексов. Изменение ионной силы среды сопровождается не только ослаблением электростатического взаимодействия вследствие экранирования зарядов, но и изменением структуры комплекса, связанным с перераспределением гидратации и конформационной подвижности макромолекул [178, 185–187].

Наряду с электростатическими взаимодействиями важную роль играют гидрофобные эффекты. Частичная экспозиция гидрофобных участков белковой поверхности способствует дополнительному связыванию амфифильных полимеров, тогда как введение гидрофобных заместителей в полимерную цепь изменяет конформацию, размеры и устойчивость комплекса. Показано, что совместное действие гидрофобных и электростатических взаимодействий обеспечивает образование наиболее устойчивых комплексов, тогда как чрезмерное увеличение гидрофобности может приводить к частичной перестройке третичной структуры белка и снижению его функциональной активности. Поэтому одним из ключевых параметров при разработке белково-полимерных систем является гидрофильно-гидрофобный баланс компонентов [184, 195, 196].

1.6.2. Белково-полимерные комплексы на межфазных границах:
межфазная активность, стабильность и ограничения

Белково-полимерные комплексы обладают выраженной межфазной активностью и способны самопроизвольно адсорбироваться на границах раздела фаз с образованием вязкоупругих межфазных слоёв. Перенос комплекса из объёма раствора на интерфейс сопровождается перераспределением гидрофобных и гидрофильных фрагментов, изменением гидратации, частичной перестройкой белковых молекул и последующим уплотнением адсорбционного слоя. Формирование межфазной плёнки

включает диффузию компонентов к поверхности, первичную адсорбцию, конформационную релаксацию и образование межмолекулярных контактов, определяющих её механические свойства и устойчивость к коалесценции [186–188].

Для полиэлектролитных систем показано, что перенос комплекса на межфазную границу сопровождается увеличением локальной концентрации белка; например, в системе бычий сывороточный альбумин–полиакриловая кислота содержание белка в адсорбционном слое достигает не менее 30 об.%. Структура формирующейся оболочки определяется совместным действием электростатических и гидрофобных взаимодействий, гидратации, стерических факторов и архитектуры полимерной цепи [179, 184].

Межфазное поведение существенно зависит от амфифильности комплекса. Белково-полимерные конъюгаты способны к самосборке с образованием мицелл, цилиндрических агрегатов, полимеросом, ламеллярных и везикулярных структур, причём их морфология определяется гидрофильно-гидрофобным балансом, архитектурой макромолекулы, молекулярной массой и длиной гидрофобного блока. Морфологические переходы сопровождаются изменением толщины, проницаемости и вязкоупругости межфазного слоя. Аналогичные закономерности описаны для амфифильных производных поливинилпирролидона, где гидрофобная модификация определяет размеры агрегатов и их способность стабилизировать межфазные структуры [195–197].

Устойчивость оболочки определяется балансом электростатических, гидрофобных и водородных взаимодействий, а также архитектурой полимерной цепи. Электростатическое притяжение обеспечивает первичную фиксацию комплекса на интерфейсе, гидрофобные взаимодействия способствуют уплотнению слоя, а водородные связи и переплетение полимерных цепей стабилизируют его структуру. Разветвлённые и привитые макромолекулы формируют более толстые и механически прочные оболочки по сравнению с линейными аналогами [189, 190].

На устойчивость межфазных комплексов существенно влияют состав среды и гидратация. Повышение ионной силы приводит к экранированию зарядов, изменению плотности упаковки и может вызывать перестройку или разрушение комплекса, хотя при умеренных концентрациях соли возможно дополнительное уплотнение слоя за счёт уменьшения внутрислойного электростатического отталкивания. Гидратированный слой обеспечивает подвижность полимерных сегментов и стерическую стабилизацию, однако его чрезмерное развитие снижает механическую прочность оболочки. Для полимерных щёток показано, что белковая адсорбция определяется толщиной гидратированного слоя, плотностью прививки и пространственным распределением цепей [178, 180, 182, 186–188, 191, 192].

Адсорбция белков на межфазной границе определяется не только химическим составом поверхности, но и её наноразмерной неоднородностью. На химически однородных гидрофобных поверхностях белки, как правило, формируют сплошной адсорбционный слой, тогда как на блок-сополимерных поверхностях адсорбция становится селективной по отношению к отдельным доменам. Для иммуноглобулина G на поверхности полистирол-блок-полиметилметакрилата показано преимущественное связывание с доменами полистирола, что свидетельствует о влиянии локальной химической неоднородности на количество, ориентацию и конформацию адсорбированных белков [185, 188, 222].

Адсорбция белков сопровождается частичной перестройкой их пространственной структуры. Увеличение площади контакта с поверхностью способствует формированию более плотной межфазной плёнки, однако одновременно может изменять вторичную и третичную структуру белка и повышать доступность гидрофобных участков. Полимерный компонент способен как ограничивать подобные изменения за счёт сохранения гидратного окружения и стерической стабилизации, так и усиливать их при наличии выраженных гидрофобных или заряженных фрагментов. Поэтому механическая прочность оболочки не всегда коррелирует с сохранением

нативной структуры и функциональной активности белка [184, 185, 193, 217–220].

После попадания белково-полимерных систем в биологические жидкости их поверхность продолжает изменяться вследствие адсорбции белков плазмы крови и других биомолекул. Формирование вторичного белкового слоя изменяет поверхностный заряд, гидратацию, механические свойства и взаимодействие частиц с клетками иммунной системы. Состав этого слоя определяется химической природой полимера, плотностью покрытия, временем контакта с биологической средой и конкурентной адсорбцией отдельных белков. Использование гидрофильных и белок-резистентных полимеров позволяет существенно уменьшить неспецифическое связывание, однако полностью исключить биологическое распознавание, как правило, не удаётся [163, 189, 190, 219–221, 228].

Несмотря на высокую эффективность белково-полимерных оболочек, их разработка сопряжена с рядом ограничений. Усиление межмолекулярных взаимодействий повышает механическую прочность и устойчивость оболочки, однако одновременно снижает её подвижность и способность к обратимой деформации. Аналогично увеличение гидрофобности способствует уплотнению межфазного слоя, но повышает вероятность агрегации и конформационной перестройки белка, тогда как увеличение доли гидрофильного компонента улучшает коллоидную стабильность ценой снижения поверхностной активности. Для ковалентных белково-полимерных конъюгатов дополнительными проблемами являются неоднородность степени модификации и возможное уменьшение биологической активности вследствие экранирования функциональных участков белковой молекулы [180, 184, 230].

На границе газ–жидкость перечисленные закономерности определяют способность белково-полимерных комплексов формировать оболочки газонаполненных дисперсных систем. Белковый компонент обеспечивает быструю адсорбцию и образование первичного межфазного каркаса, тогда как

полимер регулирует гидратацию, толщину, проницаемость, вязкоупругость и устойчивость оболочки к растворению и коалесценции. Для полимер- и белок-содержащих микропузырьков показано, что химическая природа оболочки определяет её механическую прочность, акустический отклик и долговременную стабильность, а увеличение молекулярной массы и гидрофобности полимерного компонента позволяет существенно изменять характеристики микропузырьков [2, 3, 103, 109, 114, 121, 159].

При этом одним из немногих клинически исследованных примеров микропузырьков с комбинированной белково-полимерной оболочкой является система PB127, содержащая альбумин и полимолочную кислоту. Несмотря на успешное прохождение II фазы клинических исследований, данная разработка не получила широкого клинического применения и не решила в полной мере проблему направленного регулирования структуры и межфазных свойств белково-полимерной оболочки, что подчёркивает актуальность поиска новых материалов и подходов к их конструированию [4].

Таким образом, белково-полимерные комплексы являются перспективной платформой для создания функциональных межфазных оболочек благодаря возможности независимо регулировать их состав, архитектуру, гидрофильно-гидрофобный баланс и механические свойства. Вместе с тем высокая чувствительность таких систем к условиям формирования, составу биологической среды и особенностям межмолекулярных взаимодействий требует комплексного подхода к проектированию оболочек, сочетающих высокую стабильность, биосовместимость и способность к контролируемому акустическому отклику. Именно эти задачи лежат в основе разработки новых белково-композитных микропузырьков, рассматриваемых в настоящей работе.

Анализ современных методов получения микропузырьков показал, что обеспечение одновременно высокой концентрации, воспроизводимости размеров, длительной стабильности и сохранения функциональных свойств оболочки остаётся одной из ключевых задач. Одним из наиболее

перспективных подходов является использование белково-полимерных комплексов, сочетающих биосовместимость белков с возможностью регулирования межфазных свойств. Вместе с тем к настоящему времени в литературе представлен лишь единичный пример получения белково-полимерных микропузырьков, а систематические исследования влияния природы стабилизирующих добавок, молекулярных параметров полимеров и состава межфазной оболочки на физико-химические, акустические и биологические свойства микропузырьков отсутствуют.

В связи с этим 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.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Материалы

В работе использовали бычий сывороточный альбумин (БСА), N-винил-2-пирролидон (ВП), акриловую кислоту (АК), 2,2'-азобис(2-метилпропионитрил) (AIBN), н-октилмеркаптан (ОМ), н-октадецилмеркаптан (ОДМ), тетрагидрохлорид спермина (ПАм), хлорид натрия (NaCl), йодид калия (KI), гидроксид натрия (NaOH), тиосульфат натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), флуоресцеин-изотиоцианат (FITC), родамин 6G (Rh6G), родамин В, раствор формвара, желатин, агарозу, а также модифицированный крахмал (ацетилованный дикрахмалфосфат, E1414).

Реагенты приобретали у компаний Sigma-Aldrich (Мюнхен, Германия), «Химмед» (Москва, Россия) и Ruskhim (Москва, Россия). Фотосенс® (смесь ди-, три- и тетразамещённых фракций фталоцианина алюминия) приобретали в НИОПИК (Москва, Россия). Смолы для 3D-печати (ANYCUBIC Water Washable Resin и Dental Gingiva LCD Resin) приобретали у Gorky Liquid (Нижний Новгород, Россия). Все реагенты имели аналитическую степень чистоты («ч.д.а.»), если не оговорено иное.

N-винил-2-пирролидон (ВП) и акриловую кислоту (АК) перед использованием очищали вакуумной перегонкой. 2,2'-Азобис(2-метилпропионитрил) (AIBN) очищали перекристаллизацией из этанола. Н-октилмеркаптан (ОМ) и н-октадецилмеркаптан (ОДМ) использовали без дополнительной очистки.

1,4-диоксан (Химмед, Россия) высушивали над металлическим натрием и очищали вакуумной перегонкой непосредственно перед использованием.

Деионизованную воду (удельное электрическое сопротивление не менее 18,2 МОм·см при 25 °С) получали с использованием системы очистки Milli-Q

Integral 3 (Millipore, США) и применяли для приготовления всех водных растворов.

2.2 Оборудование

Ультразвуковую обработку растворов проводили с использованием соникатора Bandelin SONOPULS HD4100 (Bandelin Electronic, Германия), оснащённого зондом TS103. Для воздействия ультразвуком использовали терапевтический ультразвуковой аппарат с центральной частотой 1 МГц и максимальной мощностью 6,4 Вт.

Спектры кругового дихроизма регистрировали на спектрополяриметре J-1500 (Jasco, Япония). ИК-Фурье спектры регистрировали на ИК-Фурье спектрометре Bruker Tensor 27 (Bruker Optics, Германия). В отдельных экспериментах использовали FTIR-спектрометр Bruker Vertex 70v (Bruker, Германия). Температуру образцов контролировали с использованием термостатируемой системы Huber (Huber, Германия). Для осушения системы применяли компрессор Jun-Air (Jun-Air, Дания).

Морфологию и размерные характеристики микропузырьков исследовали методом оптической микроскопии с использованием микроскопов NIB-FL (ЛОМО, Россия) и Olympus CX33 (Olympus, Япония). Анализ изображений проводили с использованием программного обеспечения ImageJ.

Конфокальную лазерную сканирующую микроскопию проводили на микроскопе Axio Observer.Z1/7 (Carl Zeiss, Германия).

Сканирующую электронную микроскопию проводили с использованием микроскопов Thermo Scientific Quattro S и Thermo Scientific Helios G4 PFIB UXe (Thermo Fisher Scientific, США).

Атомно-силовую микроскопию проводили на микроскопе NanoWizard 4 XP (Bruker, Швейцария).

Криоэлектронную просвечивающую микроскопию (cryoTEM) проводили на трансмиссионном электронном микроскопе Tecnai G2 12 Spirit (FEI, США) на базе ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН.

Акустические свойства микропузырьков оценивали с использованием клинической ультразвуковой системы Mindray DC-60 (Mindray, Китай), оснащённой линейным датчиком с центральной частотой 8 МГц.

Микрореологические параметры крови определяли с использованием гематологического анализатора RheoScan (RheoMedTech, Республика Корея).

Для формирования фантомов использовали формы, изготовленные методом аддитивного производства (3D-печати) (custom-made molds).

Деионизованную воду получали с использованием системы очистки Milli-Q Integral 3 (Millipore, США).

2.3 Методы

2.3.1 Синтез и характеристика сополимеров П(ВП-АК)

Серию сополимеров П(ВП-АК) синтезировали методом радикальной сополимеризации N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты в 1,4-диоксане с использованием 2,2'-азобис(2-метилпропионитрила) (AIBN) в качестве инициатора. В качестве агентов передачи цепи применяли n-алкилмеркаптаны с различной длиной углеводородной цепи – n-октилмеркаптан (ОМ, C₈) и n-октадецилмеркаптан (ОДМ, C₁₈), что позволяло варьировать среднечисловую молекулярную массу сополимеров и природу концевых групп.

В типичном опыте в реакционную смесь вводили 10 г (0,09 моль) N-винил-2-пирролидона, 0,646–0,97 г акриловой кислоты, 0,1–0,11 г AIBN и требуемое количество агента передачи цепи, растворённых в 40 мл 1,4-диоксана. Содержание ОМ или ОДМ варьировали в диапазоне 0,25–1,5 мол. %

от суммарного количества мономеров. Реакцию проводили в герметично закрытом реакционном сосуде при 70 °С в течение 3 ч.

В частности, для получения сополимеров с использованием н-октадецилмеркаптана (ОДМ) применяли его навески 0,064 г ($2,24 \times 10^{-4}$ моль) или 0,026 г ($8,9 \times 10^{-5}$ моль), что обеспечивало получение сополимеров с различной молекулярной массой, включая образцы порядка 18 кДа.

После завершения сополимеризации реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли деионизованной водой, после чего 1,4-диоксан удаляли на роторном испарителе. Полученные сополимеры очищали диализом против деионизованной воды в течение 5 суток с использованием мембраны с молекулярной отсечкой 500 Да, затем замораживали и подвергали лиофильной сушке. В ряде случаев дополнительно проводили промывку 1-метокси-2-метилпропаном.

2.3.2 Определение среднечисловой молекулярной массы методом титрования

Среднечисловую молекулярную массу синтезированных сополимеров П(ВП–АК) определяли методом анализа концевых групп с использованием обратного иодометрического титрования. Метод основан на количественном определении числа концевых тиоэфирных групп, образующихся в результате применения н-алкилмеркаптанов в качестве агентов передачи цепи при радикальной сополимеризации.

Для титрования использовали 0,1 н раствор йодида калия и 0,01 н раствор тиосульфата натрия. Раствор м-хлорпербензойной кислоты готовили растворением 0,7 г м-хлорпербензойной кислоты и 0,6 г бензойной кислоты в 250 мл охлаждённого этанола.

Навеску сополимера массой 0,2 г помещали во флакон, добавляли 20 мл раствора м-хлорпербензойной кислоты и 10 мл дистиллированной воды. Параллельно готовили контрольный образец, содержащий все те же компоненты, но без сополимера. Полученные растворы выдерживали в

течение 24 ч при 0 °С. После этого в каждую пробу добавляли избыток йодида калия объёмом 15 мл и выдерживали 15 мин для завершения реакции. Затем выделившийся йод титровали 0,01 н раствором тиосульфата натрия до исчезновения окраски.

Среднечисловую молекулярную массу рассчитывали по уравнению:

$$M_n = \frac{m \cdot 2000}{(V_{\text{контр}} - V_{\text{обр}}) \cdot c} \quad (2.1)$$

где m – масса образца сополимера, г; $V_{\text{контр}}$ – объём раствора тиосульфата натрия, израсходованный на титрование контрольного образца, мл; $V_{\text{обр}}$ – объём раствора тиосульфата натрия, израсходованный на титрование образца с сополимером, мл; c – молярная концентрация раствора тиосульфата натрия, моль/л.

Полученные значения использовали для оценки среднечисловой молекулярной массы сополимеров П(ВП–АК), синтезированных с различными агентами передачи цепи – ОМ и ОДМ, – и для сопоставления образцов с различной длиной цепи и природой концевой группы.

2.3.3. Структурная и коллоидная характеристика сополимеров П(ВП–АК)

Структуру синтезированных сополимеров П(ВП–АК) подтверждали методами ^1H и ^{13}C ядерного магнитного резонанса, а также двумерной гетероядерной корреляционной спектроскопии (HSQC). ЯМР-спектры регистрировали в растворах D_2O при 25 °С на спектрометре Bruker Avance 500 (Цюрих, Швейцария). HSQC-спектры дополнительно регистрировали в $DMSO-d_6$.

Молекулярно-массовые характеристики сополимеров анализировали методом MALDI-TOF масс-спектрометрии (Ultraflex II, Bruker, Германия) с использованием Nd:YAG-лазера (355 нм) и матрицы DHB в линейном и рефлексном режимах.

Среднечисловую молекулярную массу сополимеров определяли методом обратного иодометрического титрования, описанным в разделе 4.3.2, а также по данным ^1H ЯМР-спектроскопии.

Критические концентрации агрегации сополимеров определяли по зависимости поверхностного натяжения на границе воздух–вода от концентрации с использованием тензиометра KRÜSS (Гамбург, Германия).

Способность сополимеров к самоорганизации и образованию мицеллоподобных наноагрегатов оценивали методом динамического светорассеяния. Для этого сополимеры растворяли в деионизованной воде при концентрации 20 мг/мл при 25 °С, после чего перед измерениями подвергали ультразвуковой обработке низкой интенсивности в течение 10 мин с использованием устройства Bandelin SONOPULS HD 2070. Распределение гидродинамических диаметров агрегатов регистрировали на приборе NANO-flex II (Colloid Metrix, Германия).

2.3.4 Определение содержания звеньев акриловой кислоты в сополимерах П(ВП–АК)

Содержание звеньев акриловой кислоты в сополимерах П(ВП–АК) определяли методом прямого кислотно-основного титрования карбоксильных групп.

Навеску сополимера массой 0,1 г растворяли в 10 мл бидистиллированной воды. Полученный раствор титровали 0,01 н раствором гидроксида натрия в присутствии индикатора фенолфталеина до появления устойчивой розовой окраски, соответствующей точке эквивалентности. Эквивалентный объём раствора NaOH определяли как среднее значение по трём независимым измерениям.

Кислотное число, характеризующее содержание звеньев акриловой кислоты в сополимере, рассчитывали по уравнению:

$$\text{Кислотное число} = \frac{C_{NaOH} \cdot V_{\text{экв}} \cdot M_{NaOH}}{m \cdot 1000} \quad (2.2)$$

где C_{NaOH} – молярная концентрация раствора гидроксида натрия, моль/л;

$V_{\text{экв}}$ – объём раствора NaOH, израсходованный на титрование до точки эквивалентности, мл;

M_{NaOH} – молярная масса гидроксида натрия, г/моль;

m – масса образца сополимера, г.

На основании рассчитанного кислотного числа определяли мольную долю звеньев акриловой кислоты в сополимере. Для синтезированных образцов содержание звеньев акриловой кислоты составляло порядка 9,7 – 15,5 мол.%.

2.3.5. Получение флуоресцентно-меченных производных БСА

Флуоресцентно-меченные производные БСА получали путём ковалентного связывания белка с красителями, содержащими изотиоцианатные или NHS-эфирные группы, а также за счёт нековалентного взаимодействия с гидрофобными красителями.

БСА–FITC и БСА–RITC.

Бычий сывороточный альбумин (120 мг) растворяли в 30 мл фосфатного буфера (pH = 8). Изотиоцианат флуоресцеина (FITC) или изотиоцианат родамина В (RITC) растворяли в смеси ДМСО:вода (1:1) с концентрацией 1 мг/мл. Раствор красителя добавляли к раствору БСА при интенсивном перемешивании, после чего реакционную смесь инкубировали в течение 12 ч при 4 °С. Полученные конъюгаты очищали диализом против деионизованной воды и хранили при –20 °С. Выход продуктов составлял 97 мг (79%) для БСА–FITC и 78,2 мг (63%) для БСА–RITC. Степень мечения составляла в среднем 2 молекулы FITC и 1 молекулу RITC на одну молекулу БСА.

БСА–ICG.

БСА (100 мг) растворяли в 6 мл фосфатного буфера (pH = 7,4) и смешивали с 1 мл раствора индоцианина зелёного (ICG) с концентрацией 7 мг/мл. Смесь перемешивали в течение 3 ч, после чего очищали диализом против воды в течение 48 ч при 4 °С. Полученный комплекс хранили при –20 °С. Выход продукта составлял 93 мг (87%). В среднем на одну молекулу БСА приходилась одна молекула ICG.

БСА–Cy5.5 и БСА–Cy7.

БСА (120 мг) растворяли в 30 мл фосфатного буфера (pH = 8). Цианиновые красители Cy5.5 и Cy7 в форме NHS-эфиров растворяли в ДМСО при концентрации 2 мг/мл. Раствор красителя добавляли к раствору БСА при перемешивании, после чего смесь инкубировали в течение 12 ч при 4 °С. Образовавшиеся конъюгаты очищали диализом против деионизованной воды и хранили при –20 °С. Выход составлял 83,2 мг (65%) для БСА–Cy5.5 и 74,3 мг (58%) для БСА–Cy7. Степень мечения составляла в среднем 5 молекул Cy5.5 и 2 молекулы Cy7 на одну молекулу БСА.

2.3.6. Получение флуоресцентно-меченных производных П(ВП–АК)

Флуоресцентное мечение П(ВП–АК) проводили с использованием карбодиимидной активации карбоксильных групп сополимера.

Поли(N-винил-2-пирролидон-со-акриловая кислота) (500 мг) растворяли в 4 мл цитратного буфера (pH = 4,5). Отдельно 7,8 мг 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) растворяли в 1 мл цитратного буфера и перемешивали при 40 °С в течение 1 ч. Затем добавляли раствор 3 мг N-гидроксисукцинимид (NHS) в 1 мл буфера и продолжали перемешивание при 40 °С в течение 1 ч для активации карбоксильных групп сополимера.

После активации в систему вводили раствор родамина 6G (47,9 мг в 4 мл буфера) при интенсивном перемешивании. Реакционную смесь инкубировали в течение 12 ч при 4 °С.

Полученный конъюгат очищали диализом против деионизованной воды в течение 5 суток и затем хранили при –20 °С. Выход продукта составлял 268,47 мг (49%).

2.3.7 Получение комплексов БСА@П(ВП-АК)

Комплексы БСА@П(ВП-АК) формировали при нейтральном pH за счёт взаимодействия аминогрупп БСА и карбоксильных групп сополимера.

На первом этапе в качестве модельной системы использовали сополимер П(ВП-АК) с концевой гидрофобной группой ОДМ и среднечисловой молекулярной массой 18 кДа. Комплексы получали при массовых соотношениях белок:сополимер 15:1, 10:1, 5:1, 3:1, 1:1. Растворы готовили в деионизованной воде при исходной концентрации БСА 5 % (мас./об.). Сополимер вводили в соответствующих количествах, при этом суммарная концентрация компонентов составляла 5,33–10 % (мас./об.). Компоненты предварительно растворяли и нагревали до 50 °С, после смешения растворы инкубировали при 50 °С в течение 1 ч.

На втором этапе для той же модельной системы БСА@П(ВП-АК) ОДМ 18 кДа комплексы получали при фиксированной суммарной концентрации компонентов 52,5 мг/мл. БСА и сополимер растворяли в деионизованной воде, после чего смешивали при массовых соотношениях белок:сополимер 15:1, 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:5, 1:10 и 1:15. Растворы компонентов предварительно нагревали до 50 °С, затем смешивали и инкубировали при той же температуре в течение 1 ч. Полученные растворы использовали для синтеза микропузырьков.

На третьем этапе использовали серию сополимеров П(ВП-АК), синтезированных с концевыми группами ОМ и ОДМ и среднечисловой

молекулярной массой 3,5; 6; 8,5; 12 и 15 кДа. БСА и сополимер растворяли в деионизованной воде при суммарной концентрации компонентов 52,5 мг/мл. Комплексы формировали при массовых соотношениях белок:сополимер 50:1, 10:1, 7:1, 5:1, 3:1 и 1:1. Растворы компонентов предварительно нагревали до 50 °С, затем смешивали и инкубировали при 48 °С в течение 1 ч.

Полученные растворы комплексов БСА@П(ВП–АК) использовали непосредственно для синтеза соответствующих образцов микропузырьков.

2.3.8. Получение комплексов БСА@ПАм

Комплексы БСА@ПАм формировали за счёт электростатического взаимодействия отрицательно заряженных групп БСА с катионными аминогруппами спермина.

Для получения комплексов использовали раствор БСА концентрацией 100 мг/мл, приготовленный в физиологическом растворе. К 1 мл раствора БСА добавляли 1 мл раствора тетрагидрохлорида спермина, содержащего 0,52; 2,6; 5,2; 7,8; 10,4; 13 и 26 мг вещества, что соответствовало молярным соотношениям БСА:спермин 1:2, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 и 1:100 соответственно.

После смешения растворы инкубировали при температуре 48 °С в течение 1 ч для формирования комплексов БСА–спермин.

Полученные растворы комплексов БСА@ПАм использовали непосредственно для синтеза микропузырьков

2.3.9. Динамическое светорассеяние белка и белково-композитных комплексов

Размеры глобул белка и белково-композитных комплексов определяли методом динамического светорассеяния (DLS) с использованием анализатора ZetaSizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Малверн, Великобритания).

Метод динамического светорассеяния позволяет определять гидродинамический диаметр частиц, находящихся в растворе, на основе анализа их броуновского движения. Коэффициент диффузии частиц рассчитывают по флуктуациям интенсивности рассеянного света, возникающим вследствие временных изменений локального показателя преломления среды. На основе полученного коэффициента диффузии гидродинамический радиус частиц определяют с использованием уравнения Эйнштейна–Стокса.

Перед измерениями растворы БСА, а также комплексов БСА@П(ВП–АК) разбавляли деионизованной водой не менее чем в 40 раз. Измерения проводили при температуре 25 °С. Для каждого образца выполняли не менее трёх повторных измерений. Обработку результатов осуществляли с использованием программного обеспечения Zetasizer Software 8.00.

Дополнительно метод использовали для анализа размеров комплексов БСА@ПАм при различных молярных соотношениях БСА:спермин на разных стадиях их формирования. В этих экспериментах измерения проводили на приборе ZetaSizer Nano ZS при угле рассеяния 173° с использованием He–Ne лазера ($\lambda = 633$ нм, 5 мВт). Измерения выполняли через 30, 60, 120 и 180 мин после смешения растворов БСА и спермина; в течение этого времени образцы выдерживали при температуре 40 °С.

Перед измерениями образцы разбавляли в 20 раз, помещали в пластиковую кювету объёмом 2 мл и проводили по три последовательных измерения для каждого образца.

2.3.10. Измерение поверхностного натяжения

Поверхностное натяжение растворов БСА, сополимеров П(ВП–АК), а также комплексов БСА@П(ВП–АК) и БСА@ПАм определяли методом висящей капли.

Для регистрации и обработки изображений использовали специализированное программное обеспечение, реализованное в Matlab

(MathWorks, США). Частота регистрации параметров (поверхностное натяжение, объём и площадь поверхности капли) составляла 2 с.

Границу капли определяли путём преобразования полутонового изображения в бинарное с использованием порогового значения, рассчитанного методом Оцу. Для каждой строки пикселей определяли координаты границы капли, после чего вычисляли положение вертикальной оси симметрии путём усреднения полученных значений.

Расчёт поверхностного натяжения проводили на основе решения уравнения Юнга–Лапласа с использованием метода идентификации системы, минимизирующего расхождение между экспериментальной формой капли и теоретически рассчитанным профилем.

Для каждого образца формировали висящую каплю и регистрировали изменение поверхностного натяжения в течение 10 мин при комнатной температуре. Измерения проводили в четырёх повторностях. В качестве итогового значения использовали среднее значение поверхностного натяжения и стандартное отклонение, рассчитанные по последним 2 мин каждого измерения.

2.3.11. ИК-Фурье спектроскопия комплексов БСА@П(ВП–АК) в режиме пропускания

ИК-Фурье спектры комплексов БСА@П(ВП–АК) (для модельной системы с сополимером П(ВП–АК) с концевой группой ОДМ и среднечисловой молекулярной массой 18 кДа) регистрировали на спектрометре Bruker Vertex 70v (Bruker, Германия) в режиме пропускания.

Образцы наносили на диафрагму толщиной 0,1 мм с отверстием диаметром 1 мм, что обеспечивало прохождение всего падающего излучения через исследуемый образец.

Полученные спектры нормировали на спектр диафрагмы. В результате регистрировали спектр пропускания подложки Si/SiO₂ с нанесённым образцом. Спектр чистой подложки характеризовался наличием полос при

460, 815 и 1080 см^{-1} , соответствующих колебаниям Si–O (качательные, деформационные и валентные), а также полосы при 615 см^{-1} , обусловленной фононными колебаниями в объёме кремния.

Осцилляции в области ниже 1000 см^{-1} связаны с интерференцией Фабри–Перо в подложке. В диапазоне выше 1300 см^{-1} спектр подложки представляет собой медленно изменяющуюся функцию без выраженных полос; поэтому все полосы в этой области относили к исследуемому образцу.

2.3.12. Атомно-силовая микроскопия

Морфологию комплексов БСА@П(ВП–АК) исследовали методом атомно-силовой микроскопии с использованием микроскопа Bruker NanoWizard 4 XP (Bruker, Германия) в полуконтактном режиме на воздухе.

Перед измерениями растворы комплексов разбавляли деионизованной водой в 10–100 раз. В качестве подложки использовали слюду. Пластинку слюды размером 15 × 15 мм помещали в раствор комплекса на 5 мин, после чего избыток раствора удаляли промывкой деионизованной водой и образец высушивали на воздухе.

Измерения проводили с использованием поликремниевых кантилеверов FESP-V2 с резонансной частотой около 76 кГц и добротностью порядка 300.

Обработку и анализ изображений выполняли с использованием программного обеспечения Gwyddion 2.65 (Чешский метрологический институт, Брно, Чехия).

2.3.13. Протокол молекулярного моделирования взаимодействий БСА@П(ВП–АК) в составе комплекса

Молекулярно-динамическое моделирование взаимодействий БСА с сополимерами П(ВП–АК) проводили с использованием программного пакета GROMACS 2020.6. Параметры силового поля задавали в рамках OPLS-AA, молекулы воды описывали моделью SPC/E.

Кристаллическую структуру БСА получали из базы данных Protein Data Bank. В моделирование включали сополимеры П(ВП–АК) с концевыми группами ОМ и ОДМ и молекулярной массой 8,5 кДа (81 мономерное звено).

Систему формировали в кубической ячейке размером 12,77 нм с периодическими граничными условиями. Для обеспечения электрической нейтральности добавляли ионы Na^+ .

Короткодействующие взаимодействия Леннарда–Джонса рассчитывали с радиусом отсечения 1,2 нм, электростатические взаимодействия – методом PME. Ограничение колебаний связей осуществляли с использованием алгоритма LINCS.

После предварительной релаксации проводили основной расчёт длительностью 300 нс с временным шагом 2 фс в ансамбле NPT при температуре 300 К и давлении 1 бар с использованием термостата velocity-rescale и баростата Парринелло–Рамана.

Анализ взаимодействий проводили по последним 50 нс моделирования, рассчитывая число контактов между функциональными группами сополимера и аминокислотными остатками БСА. Контактom считали наличие более 10 атомов различных молекул на расстоянии менее 0,6 нм.

2.3.14 Протокол моделирования взаимодействий БСА с добавками

Молекулярно-динамическое моделирование систем БСА с ПАм и П(ВП–АК) проводили с использованием пакета GROMACS 2020.6. Параметры взаимодействий задавали в рамках силового поля OPLS-AA, модель воды – SPC/E.

В расчётную ячейку размером $15 \times 15 \times 15 \text{ нм}^3$ помещали три молекулы БСА и соответствующее количество молекул добавки (ПАм или П(ВП–АК)), после чего систему сольватировали водой (~110 000 молекул).

Короткодействующие взаимодействия рассчитывали с радиусом отсечения 1,2 нм, дальнodayствующие электростатические взаимодействия – методом PME. Связи с участием атомов водорода фиксировали с использованием алгоритма LINCS.

Моделирование начинали с релаксации в ансамбле NVT в течение 1 нс, затем проводили уравнивание с использованием баростата Берендсена (50 нс), после чего выполняли основной расчёт длительностью 500 нс с использованием баростата Парринелло–Рамана.

Анализ проводили по последним 100 нс моделирования, оценивая контакты между БСА и добавками, а также коэффициенты диффузии. Контактom считали сближение атомов различных компонентов на расстояние менее 0,6 нм.

2.3.15 Оценка тушения флуоресценции триптофана БСА при комплексообразовании

Флуоресцентные спектры регистрировали с использованием спектрофлуориметра Jasco FP-8300 (Jasco, Япония), оснащённого кварцевыми кюветами Hellma QS и термостатируемым держателем кювет с перемешиванием (Jasco ETC-815).

Растворы БСА готовили в деионизованной воде. Рабочий раствор БСА имел концентрацию 5 мкМ. Растворы ПАМ и П(ВП–АК) готовили с концентрацией 400 мкМ. Добавки вводили в раствор БСА для получения молярных соотношений БСА:добавка 1:0; 1:0,5; 1:1; 1:2; 1:4; 1:8 и 1:16.

Измерения проводили при температуре 50 °С при постоянном перемешивании (700 об/мин). Спектры регистрировали в диапазоне 290–500 нм при длине волны возбуждения 280 нм. Интенсивность эмиссии триптофана БСА анализировали в области максимума (~345 нм).

Дополнительно регистрировали спектры поглощения в диапазоне 250–500 нм с использованием спектрофотометра Jasco V-770.

2.3.16 Крио-трансмиссионная электронная микроскопия комплексов

Для исследования морфологии комплексов БСА@П(ВП–АК) использовали метод крио-трансмиссионной электронной микроскопии.

На медную сетку (300 mesh), покрытую перфорированной углеродной плёнкой с ячеистой структурой, наносили 3 мкл раствора комплекса. Перед нанесением образца сетки обрабатывали воздушной плазмой для придания поверхности гидрофильных свойств.

Избыток раствора удаляли промоканием в течение 1 секунды, после чего сетку немедленно витрифицировали путём быстрого погружения в жидкий этан с использованием автоматизированной системы быстрого замораживания (Vitrobot, FEI, США). В результате образец фиксировался в аморфном льде.

После витрификации образцы переносили в жидком азоте в просвечивающий электронный микроскоп Tecnaï G2 Spirit (FEI, США), где проводили регистрацию изображений при криогенных условиях.

2.3.17 Микропузырьки на основе БСА

Микропузырьки с оболочкой из БСА получали методом ультразвуковой обработки раствора белка. Раствор БСА в деионизованной воде (5 % мас./об., объём 2 мл) нагревали до 50 °С, после чего наконечник сонотрода TS103 ультразвукового диспергатора Bandelin SONOPULS HD4100 (Bandelin Electronic, Германия) располагали на границе раздела фаз воздух–жидкость и проводили обработку в течение 3 минут при максимальной мощности 100 Вт. После синтеза образцы выдерживали при 4 °С в течение 30 минут для стабилизации микропузырьков.

2.3.18 Микропузырьки на основе комплексов БСА@П(ВП–АК) (ОДМ, 18 кДа)

Микропузырьки получали из растворов комплексов БСА@П(ВП–АК) с концевой гидрофобной группой ОДМ и среднечисловой молекулярной массой 18 кДа. Растворы комплексов (2 мл) нагревали до 50 °С и подвергали

ультразвуковой обработке с использованием диспергатора Bandelin SONOPULS HD4100 с зондом TS103, располагаемым на границе раздела фаз воздух–жидкость. Обработку проводили в течение 3 минут при мощности 100 Вт. После синтеза образцы выдерживали при 4 °С в течение 30 минут. Использовали массовые соотношения белок:сополимер 10:1, 5:1 и 3:1.

2.3.19 Микропузырьки на основе библиотеки БСА@П(ВП–АК) (3,5–15 кДа)

Микропузырьки синтезировали из растворов комплексов БСА@П(ВП–АК), полученных с использованием сополимеров с концевыми группами ОМ и среднечисловой молекулярной массой 3,5; 6; 8,5; 12 и 15 кДа. Комплексы формировали при массовых соотношениях белок:сополимер в диапазоне от 50:1 до 3:1.

Растворы комплексов (2 мл) нагревали до 50 °С и подвергали ультразвуковой обработке с использованием диспергатора Bandelin SONOPULS HD4100 (зонд TS103), располагаемого на границе раздела фаз воздух–жидкость. Обработку проводили в течение 3 минут при максимальной мощности 100 Вт. После синтеза образцы выдерживали при 4 °С в течение 30 минут для стабилизации.

2.3.20 Микропузырьки на основе комплексов БСА–ПАм

Комплексы БСА–ПАм получали смешением 1 мл раствора БСА (100 мг/мл) с 1 мл раствора тетрагидрохлорида спермина в физиологическом растворе при мольных соотношениях БСА:спермин 1:2, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 и 1:100. Полученные растворы инкубировали при температуре 40–45 °С в течение 1 часа.

После этого растворы (2 мл) нагревали до 50 °С и подвергали ультразвуковой обработке с использованием диспергатора Bandelin SONOPULS HD4100 с зондом TS103, располагаемым на границе раздела фаз воздух–жидкость, в течение 3 минут при мощности 100 Вт. После синтеза образцы выдерживали при 4 °С для стабилизации микропузырьков.

2.3.21 Флуоресцентно-меченные микропузырьки

Флуоресцентно-меченные микропузырьки получали с использованием предварительно синтезированных меченных производных БСА (БСА-FITC, БСА-RITC, БСА-ICG, БСА-Cy5.5, БСА-Cy7), а также при необходимости сополимеров П(ВП–АК), меченных родамином 6G.

В исходный раствор вводили 1 мг меченного БСА, при этом остальной белок представлял собой немеченный БСА. В зависимости от условий эксперимента сополимер П(ВП–АК) использовали в меченной или немеченной форме. Полученные растворы (2 мл) нагревали до 50 °C и подвергали ультразвуковой обработке с использованием диспергатора Bandelin SONOPULS HD4100 с зондом TS103, располагаемым на границе раздела фаз воздух–жидкость, в течение 3 минут при мощности 100 Вт. После синтеза образцы выдерживали при 4 °C в течение 30 минут.

2.3.22 Получение отмытых микропузырьков

После синтеза микропузырьков для получения отмытых микропузырьков, через 24 часа после получения, нижнюю жидкую фазу под слоем всплывших микропузырьков, содержащую несвязанные компоненты, удаляли, после чего микропузырьки ресуспендировали в деионизованной воде. Процедуру повторяли до удаления растворённых примесей и стабилизации состава дисперсии.

2.3.23 Разрушение микропузырьков терапевтическим ультразвуком

Для получения разрушенных микропузырьков образцы подвергали воздействию терапевтического ультразвука с использованием устройства (Shenzhen Dong Di Xin Technology Co. Ltd., Китай) с центральной частотой 1 МГц и максимальной мощностью 6,4 Вт.

Обработку проводили в течение 5 минут при исходной концентрации микропузырьков. Полученные образцы использовали для анализа структурного состояния белка после разрушения межфазной оболочки.

2.3.24 Анализ серий ИК-Фурье спектров комплексов БСА@П(ВП–АК) и соответствующих микропузырьков

Спектры ИК-Фурье с насадкой НПВО регистрировали для водных растворов сополимеров П(ВП–АК), комплексов БСА@П(ВП–АК) с различными молекулярными массами и массовыми соотношениями компонентов, а также соответствующих суспензий микропузырьков.

В исследовании использовали серию сополимеров П(ВП–АК) с концевыми группами ОМ и среднечисловой молекулярной массой 3,5; 6; 8,5; 12 и 15 кДа. Для каждой системы регистрировали спектры нативного БСА, микропузырьков БСА, соответствующих белково-полимерных комплексов и микропузырьков на их основе. Комплексы БСА@П(ВП–АК) получали и анализировали при массовых соотношениях белок:сополимер 10:1, 7:1, 5:1 и 3:1, что позволяло проследить влияние состава и молекулярной массы сополимера на структурное состояние белка как в растворе, так и в составе межфазной оболочки микропузырьков.

Измерения проводили на спектрометре Bruker Tensor 27 (Bruker Optics, Германия), оснащённом НПВО приставкой с кристаллом ZnSe (однократное отражение) и МСТ-детектором, охлаждаемым жидким азотом. Температуру образцов поддерживали на уровне 25 °С с использованием термостатируемой системы Huber.

Для каждого измерения 40 мкл образца наносили на поверхность НПВО кристалла. Спектры регистрировали в диапазоне 2200–850 см⁻¹ с разрешением 1 см⁻¹, усредняя 70 сканов. Перед серией измерений регистрировали фоновый спектр деионизованной воды. Для минимизации атмосферных помех систему продували сухим воздухом (компрессор Jun-Air).

Обработку спектров проводили в программном обеспечении OPUS 8.1 (Bruker).

Для оценки структурного состояния белка анализировали область 1800–1400 см^{-1} . Положение полос Амид I и Амид II определяли с использованием второй производной спектра.

Деконволюцию области Амид I выполняли методом аппроксимации гауссовыми функциями с использованием алгоритма Левенберга–Марквардта с фиксированными максимумами при 1624, 1630, 1637, 1648, 1655, 1675 и 1691 см^{-1} . Качество аппроксимации контролировали по среднеквадратичной ошибке ($\text{RMS} < 0,00001$).

Отношение интенсивностей полос Амид II и Амид I рассчитывали по интегральным интенсивностям при 1545 и 1652 см^{-1} соответственно. Перед анализом выполняли коррекцию базовой линии.

2.3.25 Обработка ИК-Фурье спектров для анализа структурных преобразований БСА и белково-композитных систем

Анализ структурных преобразований БСА и белково-композитных систем проводили методом ИК-Фурье спектроскопии. Спектры регистрировали на спектрометре Bruker Tensor 27 (Bruker Optics, Эттлинген, Германия), оснащённом НПВО приставкой с кристаллом ZnSe с однократным отражением и МСТ-детектором, охлаждаемым жидким азотом. Температуру образцов поддерживали на уровне 25 °C с использованием термостатируемой системы Huber.

В рамках исследования регистрировали спектры нативного БСА, соникатированного БСА, микропузырьков на основе БСА, а также систем, содержащих добавки различной природы. Для низкомолекулярной добавки (ПАм, спермин) анализировали как некомплексированные смеси, так и сформированные комплексы БСА–ПАм, а также соответствующие микропузырьки БСА@ПАм. Для макромолекулярной добавки П(ВП–АК) исследовали аналогичный набор состояний, включая смеси, комплексы БСА@П(ВП–АК) и микропузырьки на их основе. Таким образом, анализ

охватывал последовательные стадии перехода от свободного белка к комплексам и далее к межфазно-организованным структурам.

Для каждого измерения 40 мкл образца (раствор комплекса, смесь, суспензия микропузырьков, а также нативный или соникатированный БСА) наносили непосредственно на поверхность НПВО кристалла. Перед каждой серией измерений регистрировали фоновый спектр деионизованной воды. Спектры записывали в диапазоне $2200\text{--}850\text{ см}^{-1}$ с разрешением 1 см^{-1} , усредняя 70 сканов для каждого образца. Для минимизации влияния атмосферных примесей система непрерывно продувалась сухим воздухом (компрессор Jun-Air).

Обработку спектральных данных проводили с использованием программного обеспечения OPUS 8.1 (Bruker). Перед анализом все спектры подвергали коррекции базовой линии.

Для детального анализа структурных изменений белка рассматривали область $1700\text{--}1450\text{ см}^{-1}$, включающую полосы Амид I ($1700\text{--}1600\text{ см}^{-1}$) и Амид II ($1580\text{--}1500\text{ см}^{-1}$). Положение основных компонент определяли по второй производной спектра.

Деконволюцию полосы Амид I выполняли методом аппроксимации гауссовыми функциями с использованием алгоритма Левенберга–Марквардта с фиксированными максимумами при 1624, 1630, 1637, 1648, 1655, 1675 и 1691 см^{-1} . Процедуру аппроксимации ограничивали условием сохранения среднеквадратичной ошибки остатка ниже 0,00001.

Количественную оценку структурных изменений проводили по отношению интегральных интенсивностей полос Амид II и Амид I, рассчитываемому при 1545 и 1652 см^{-1} соответственно. Для сопоставления различных состояний белка полученные значения нормировали относительно среднего значения для нативного БСА.

2.3.26 Спектроскопия кругового дихроизма (КД)

Спектры кругового дихроизма регистрировали в дальнем ультрафиолетовом диапазоне с использованием спектрополяриметра J-1500 (Jasco, Токио, Япония) для оценки конформационного состояния БСА в растворе, в составе белково-композитных комплексов и в оболочке микропузырьков.

В исследовании анализировали нативный БСА, соникатированный БСА, микропузырьки на основе БСА, а также системы с добавками различной природы. Для низкомолекулярной добавки ПАм (спермин) исследовали некомплексированные смеси БСА с добавкой, соответствующие комплексы БСА–ПАм и микропузырьки БСА@ПАм. Для макромолекулярной добавки П(ВП–АК) анализировали аналогичный набор состояний, включая смеси, комплексы БСА@П(ВП–АК) и микропузырьки на их основе. Дополнительно исследовали микропузырьки после ультразвукового разрушения, что позволяло сопоставить структурное состояние белка до и после разрушения межфазной оболочки.

В качестве контрольного образца, характеризующего разупорядоченную структуру белка, использовали «соникатированный БСА», полученный обработкой 5 % (мас./об.) раствора БСА ультразвуком (Bandelin SONOPULS HD4100, зонд TS103) при максимальной мощности в течение 10 минут без отвода тепла. Образцы «разрушенных МП» получали воздействием терапевтического ультразвука (центральная частота 1 МГц, максимальная мощность 6,4 Вт) в течение 5 минут.

Перед измерениями все образцы свежеприготовленно разбавляли в 1000 раз деионизованной водой для предотвращения оптического насыщения и обеспечения корректного расчёта g-фактора. Спектры регистрировали в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 мм при температуре 25 °С, ширине спектральной щели 2 нм, скорости сканирования 20–50 нм/мин и

времени цифровой интеграции 8–16 с. Для каждого образца усредняли три независимых сканирования.

Измерения проводили в диапазоне 185–260 нм, при этом количественный анализ ограничивали областью 185–230 нм вследствие увеличения уровня шума при более длинных волнах, что снижает точность деконволюции и оценки вторичной структуры.

Спектры поглощения регистрировали параллельно в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 мм при тех же условиях разбавления.

Полученные спектры g-фактора анализировали по характерным признакам α -спиральной структуры, включая положение и глубину отрицательного минимума в области 222–227 нм, наклон спектра в диапазоне 195–225 нм, а также отклонения формы спектра, указывающие на частичное разворачивание белка, агрегацию или изменение внутримолекулярных взаимодействий. Изменения спектральной формы интерпретировали с точки зрения дестабилизации, реорганизации вторичной структуры или влияния добавок и межфазной адсорбции.

2.3.27 Оптическая микроскопия

Оптическую микроскопию микропузырьков проводили с использованием микроскопа Olympus CX33 (Olympus Corporation, Япония), оснащённого объективом Plan Achromat C 40 $\times$ (NA 0,65; рабочее расстояние 0,60 мм; толщина покровного стекла 0,17 мм). Дополнительно для обзорных измерений использовали микроскоп NIB-FL (LOMO-MA LLC, Россия) в диапазоне увеличений 40 $\times$ –400 $\times$.

Распределение микропузырьков по размерам определяли на основе анализа микрофотографий с использованием программного обеспечения ImageJ. Для каждого образца анализировали не менее 250 микропузырьков.

Концентрацию микропузырьков определяли с использованием счётной камеры. В камеру вводили 10 мкл исследуемого образца, выдерживали при комнатной температуре (≈ 25 °C) в течение 5 минут, после чего регистрировали

изображения в пределах измерительной сетки. Для каждого образца получали не менее пяти микрофотографий, каждое измерение повторяли не менее пяти раз.

2.3.28. Сканирующая электронная микроскопия

Для проведения сканирующей электронной микроскопии водные суспензии микропузырьков наносили на кремниевую подложку. Подложку фиксировали на держателе образца с использованием проводящей двусторонней углеродной ленты. После нанесения образца его покрывали проводящим углеродным слоем толщиной 5 нм.

Держатель с образцом помещали в камеру микроскопа и эвакуировали до остаточного давления ниже 10^{-3} Па.

Исследования проводили на сканирующих электронных микроскопах Thermo Scientific Quattro S и Thermo Scientific Helios G4 PFIB UXe (Thermo Fisher Scientific, США). Съёмку выполняли при ускоряющем напряжении 5 кВ и токе пучка 64 пА (Quattro S), а также при 2 кВ и 25 пА (Helios G4 PFIB UXe).

Регистрацию изображений осуществляли в режиме детектирования вторичных электронов, что позволяло анализировать морфологию, форму и размерные характеристики микропузырьков.

Толщину оболочки определяли по СЭМ-изображениям с использованием программного обеспечения ImageJ. Для каждого образца анализировали не менее 50–100 микропузырьков.

2.3.29 Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

Конфокальную лазерную сканирующую микроскопию выполняли на системе Axio Observer.Z1/7 с объективом Plan-Apochromat 40×/1.3 Oil DIC (UV–VIS–NIR M27) (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) для оценки распределения БСА и П(ВП-АК) в оболочке микропузырьков.

БСА ковалентно метили флуоресцеин-изотиоцианатом, а П(ВП-АК) – родамином 6G. Мечение и очистку меченых соединений методом диализа

проводили до получения микропузырьков согласно ранее описанной методике.

2.3.30 Крио-трансмиссионная электронная микроскопия

Для крио-трансмиссионной электронной микроскопии 3 мкл каждого образца наносили на медную сетку с размером ячейки 200 mesh, покрытую углеродной плёнкой с ячеистой структурой.

Перед использованием сетку обрабатывали воздушной плазмой для очистки поверхности. Избыток образца удаляли промоканием сетки в течение 1 секунды, после чего её немедленно погружали в жидкий этан с использованием автоматизированной системы быстрого замораживания (Vitrobot FEI, США). В результате образец фиксировался в аморфном льду.

Далее сетку переносили в жидком азоте в трансмиссионный электронный микроскоп Tecnaï G2 12 SPIRIT (FEI, США).

2.3.31 Оценка акустического отклика

Акустический отклик полученных микропузырьков оценивали с использованием клинических ультразвуковых систем Siemens Acuson S2000 (Siemens Healthineers AG, Германия) и Mindray DC-60 (Mindray, Китай), оснащённых линейным датчиком Acuson 9L4 с центральной частотой 8 МГц.

Измерения проводили в проточном тканеподобном фантоме с моделируемым сосудистым каналом, изготовленном на основе желатина или смеси агарозы и желатина. В первом случае 10 мас. % желатина растворяли в 100 мл деионизированной воды и нагревали до 70 °С при интенсивном перемешивании. Во втором случае использовали смесь агарозы (3 мас. %) и желатина (7 мас. %), которую нагревали до 100 °С до получения однородного геля.

Для формирования канала в фантоме металлическую или пластиковую трубку диаметром 2 мм фиксировали в специально изготовленном держателе; в ряде экспериментов её покрывали тонким слоем формвара для предотвращения деформации стенок канала. После заливки геля систему

выдерживали при 4 °С в течение ночи до полного отверждения. Перед началом измерений трубку удаляли, формируя полый канал.

К фантомному устройству подключали перистальтический насос (Modular BioSystems Inc., США), обеспечивающий постоянный поток суспензии микропузырьков со скоростью 2–4,5 мл/мин.

Перед измерениями все образцы микропузырьков разбавляли до концентрации 1×10^8 МП/мл и переносили в физиологический раствор или плазму крови. В отдельных экспериментах концентрацию дополнительно нормировали по газовой дозе (640 мкл/мл).

Измерения проводили при температуре 25 °С при одинаковых гидродинамических условиях для всех образцов. Ультразвуковую визуализацию осуществляли в В-режиме и НКР. Механический индекс устанавливали равным 0,16 для предотвращения быстрого разрушения микропузырьков.

Регистрацию сигнала проводили в течение 12–20 минут при постоянной скорости потока. Время жизни сигнала в НКР рассчитывали как интервал времени, в течение которого интенсивность сигнала превышала половину начального значения.

2.3.32 Исследование динамики кавитации в растворах материалов оболочки МП

Переходную активность кавитационных пузырьков (далее по тексту обозначаемых как предшественники МП, формирующиеся в процессе ультразвукового синтеза) исследовали с использованием ультразвукового генератора UZG 55–22 и кавитометра ICA-5D, разработанных в Белорусском государственном университете информатики и радиоэлектроники (Минск, Беларусь).

Для проведения экспериментов готовили по 40 миллилитров растворов каждого состава (растворы БСА, БСА@ПАм и БСА@П(ВП–АК) концентрацией 1 % (мас./об.), а также деионизованную воду в качестве

контроля) и помещали их в отдельные чашки Петри. В качестве источника ультразвуковых колебаний использовали титановый соноотрод, работающий при амплитуде колебаний 14 микрон, откалиброванной с использованием виброметра VM1–5 (Минск, Беларусь).

Соноотрод имел диаметр 12 миллиметров и работал в непрерывном режиме при частоте 20 кГц и мощности 100 ватт, что соответствовало параметрам установки, использованной для синтеза МП, описанного выше. Соноотрод устанавливали под углом 45 градусов относительно поверхности чашки Петри, обработку суспензий проводили в течение 15 минут. Все эксперименты выполняли при 25 градусах Цельсия.

Эффективность кавитации оценивали по величине суммарной кавитационной активности, уделяя особое внимание числу схлопывающихся пузырьков, связанных с переходной кавитацией. Для этого датчик кавитометра располагали на расстоянии 3 сантиметров от центра наконечника соноотрода. Датчик кавитометра имел цилиндрическую форму диаметром 3 миллиметра и содержал пьезоэлектрическую пластину, закреплённую на одном конце. Посредством встроенного волновода акустический сигнал из зоны кавитации передавался на пьезоэлектрическую пластину, где преобразовывался в электрический сигнал.

Специализированное программное обеспечение кавитометра регистрировало данные о кавитационной активности и передавало их на персональный компьютер в режиме реального времени. В ходе обработки температуру раствора непрерывно контролировали. Дополнительно использовали датчик Hielscher (Hielscher Technologies, Германия) для контроля частоты ультразвукового воздействия, выходной мощности и суммарной энергии, подведённой к системе.

2.3.33 Высокоскоростная видеорегистрация формирования предшественников МП

Динамику эволюции МП регистрировали с использованием высокоскоростной камеры Phantom Miro C110 (Vision Research, США) с разрешением 768×768 пикселей, установленной на оптическом микроскопе Mikmed-6 (ЛОМО, Россия). Первичную обработку изображений и видеоданных проводили с использованием программного обеспечения Phantom CV 3.3.

Для обеспечения отслеживания синтезируемых предшественников МП в режиме реального времени реализовали сегментацию отдельных объектов с использованием метода SORT, при этом обнаружение объектов осуществляли на основе модели YOLOv11. Обучающую выборку формировали в два этапа: на первом этапе начальные контуры получали с использованием модели YOLOv8, ранее обученной на изображениях кавитационных пузырьков в предыдущих работах; затем выполняли ручную корректировку и категоризацию на два класса – пузырьки в фокусе и вне фокуса, в результате чего было получено 607 размеченных изображений.

Путём аугментации изображений на платформе Roboflow набор данных расширяли до 1365 изображений и приводили к формату, пригодному для обучения. Обучение и оптимизацию модели проводили с использованием библиотеки Ultralytics с целью повышения точности сегментации МП.

В видеопотоке в режиме реального времени существенное значение имеют как точность обнаружения, так и точность отслеживания объектов. Было установлено, что МП иногда покидали поле зрения и повторно появлялись в кадре, что приводило к ошибочной идентификации их как новых объектов. Для устранения данного эффекта применяли алгоритм отслеживания SORT. Каждый кадр видеообработки пропускали через модель YOLOv11 для обнаружения пузырьков, при поддержке модуля Difference

Detector, выделяющего изменения между последовательными кадрами для повышения точности.

Положение пузырьков прогнозировали с использованием фильтра Калмана, а сопоставление прогнозов с новыми обнаружениями выполняли методом ByteSORT с применением расстояния Левенштейна.

Показатели precision (0,79) и recall (0,80) свидетельствуют о сбалансированной точности обнаружения, значение mAP 50 (0,84) подтверждает высокую точность при стандартных порогах, а показатель mAP 50–95 (0,65) отражает устойчивую эффективность при более строгих критериях оценки.

Для взаимодействия пользователя с обученной моделью и получения графиков движения 20 наиболее долгоживущих пузырьков были подготовлены репозиторий на платформе GitHub (см. раздел «Доступность данных») и веб-интерфейс. Средние значения и стандартные отклонения рассчитывали на основании 10 зарегистрированных кривых в интервале 0–15 минут. Доверительный интервал как для среднего значения, так и для стандартного отклонения не превышал 5 %.

2.3.33 Оценка реологии крови в присутствии МП

В эксперименте использовали образцы крови шести здоровых доноров мужского пола в возрасте 20–30 лет. Кровь отбирали из кубитальной вены в пробирки Vacuette EDTA K3E. Научные исследования с использованием образцов донорской крови проводили в соответствии с Разрешением № 11/22 от 05.12.2022, выданным Этическим комитетом Международного образовательного медицинского центра Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. От всех участников было получено информированное согласие, все процедуры выполняли в соответствии с Хельсинкской декларацией.

Растворы нативного БСА, комплексов БСА@ПАм и БСА@П(ВП–АК) готовили в деионизованной воде, после чего доводили до концентрации 0,9 %

NaCl для соответствия ионной силе крови. Аналогичным образом соответствующие образцы МП готовили в деионизованной воде, выдерживали в течение ночи до всплытия, после чего надосадочную жидкость (раствор под слоем МП) заменяли физиологическим раствором.

В качестве коммерческого липидного препарата сравнения использовали MicroMarker (Bracco S.p.A., Женева, Швейцария), который ресуспендировали в физиологическом растворе в соответствии с инструкцией производителя; физиологический раствор использовали в качестве контроля.

Для оценки агрегации эритроцитов 900 микролитров цельной крови смешивали со 100 микролитрами тестируемого образца (комплексы с общей концентрацией реагентов 5 % (мас./об.) или МП с концентрацией 10^8 , 10^9 МП/миллилитр). Смеси инкубировали в течение 10 минут при 25 градусах Цельсия.

Для оценки деформируемости эритроцитов 10 микролитров полученной смеси для агрегации добавляли к 490 микролитрам 5,5 % раствора поливинилпирролидона.

2.3.34 Лазерная агрегометрия и эктацитометрия

Параметры агрегации и деформируемости определяли с использованием клинического гематологического анализатора RheoScan (RheoMedTech, Сеул, Республика Корея).

Деформируемость эритроцитов измеряли в режиме лазерной эктацитометрии в присутствии раствора поливинилпирролидона при диапазоне сдвиговых напряжений от 1 до 20 паскалей. Индекс деформируемости (DI) рассчитывали по уравнению:

$$DI = \frac{a - b}{a + b} \quad (2.3)$$

где a и b – соответственно большая и малая оси эллиптической дифракционной картины эритроцитов. Низкие значения сдвигового напряжения (3 паскаля) преимущественно характеризовали свойства

мембраны эритроцитов, тогда как высокие значения (20 паскалей) отражали максимальную деформируемость (например, геометрию клетки и соотношение площади поверхности к объёму).

Параметры агрегации оценивали в режиме лазерной агрегометрии. Кинетику агрегации анализировали путём приложения сдвигового напряжения с использованием мешалки со скоростью 1000 оборотов в минуту в течение 9 секунд для разрушения агрегатов эритроцитов. Интенсивность света, рассеянного вперёд при длине волны 635 нанометров, регистрировали, при этом максимум соответствовал полной дезагрегации, после чего наблюдали постепенное снижение интенсивности по мере повторного образования агрегатов. На основании полученных данных рассчитывали, в частности, индекс агрегации (ИА), количественно характеризующий процент клеток, агрегированных в течение 10 секунд.

Критическое сдвиговое напряжение определяли путём анализа интенсивности обратнорассеянного света (силлектограмма), отражающей минимальное сдвиговое напряжение, необходимое для предотвращения агрегации эритроцитов.

Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения RheoScan. Для учёта междонорской вариабельности и выделения влияния МП и материалов оболочки данные нормировали следующим образом: для каждого донора рассчитывали среднее значение контрольного образца (группа физиологического раствора), после чего все соответствующие экспериментальные значения для остальных групп и для данного донора делили на указанное среднее, получая нормированные значения в пределах одного донора.

Дополнительно для оценки разброса измерений все исходные значения контрольной группы физиологического раствора (по всем донорам) объединяли, рассчитывали общее среднее значение данной группы, после чего исходные контрольные значения нормировали относительно этого среднего, что позволяло оценить ожидаемый диапазон вариабельности.

2.3.35. Ультразвуковая визуализация *in vivo*

Все процедуры с использованием животных были одобрены Комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н. И. Пирогова (протокол № 22/2024).

Исследование проводили на самцах крыс линии Wistar (возраст 2 месяца, масса 200–250 г; $n = 3$ в каждой группе, всего 18 животных).

Все эксперименты выполняли под общей анестезией. Анестезию осуществляли путём внутривентрального введения зоветила (20 мг/кг, 50 мкл; Virbac SA, Франция) и ксилазина (7 мг/кг, 10 мкл; Spofa, Чешская Республика). Эвтаназию животных проводили через 3 и 24 часа после введения препаратов путём экспозиции CO₂.

Для экспериментов использовали микропузырьки БСА, БСА@ПАм и БСА@П(ВП–АК) (ОМ 8,5 кДа, массовое соотношение 5:1). Для флуоресцентной маркировки микропузырьков предварительно получали конъюгат БСА@Су5.5 с последующим формированием белково-полимерных комплексов и микропузырьков. После синтеза микропузырьки многократно промывали для удаления несвязанного красителя и переносили в физиологический раствор.

Животным вводили суспензию микропузырьков через катетер в хвостовую вену. Доза составляла $(1–10) \times 10^8$ МП в объёме 0,1–0,2 мл в зависимости от серии экспериментов. После инъекции дополнительно вводили 0,05 мл физиологического раствора для промывания катетера. В контрольной группе использовали физиологический раствор аналогичного объёма.

Ультразвуковую визуализацию сердца проводили в В-режиме и НКР с использованием клинической ультразвуковой системы Mindray DC-60 с линейным датчиком частотой 8 МГц. Механический индекс устанавливали в

диапазоне 0,14–0,16. Регистрацию кинопетель выполняли в течение 5 минут после введения при частоте 10 кадров/с.

Температуру тела животных поддерживали с использованием термостатируемой платформы на протяжении всего эксперимента.

Интенсивность ультразвукового сигнала в режиме НКР количественно оценивали с использованием программного обеспечения ImageJ. Для анализа выбирали область интереса (ROI) в полости левого желудочка. Коррекцию движения не применяли; сглаживание временных зависимостей интенсивности выполняли с использованием полиномиальной аппроксимации второго порядка с окном 30 точек.

2.3.36. Анализ крови и исследование распределения в организме

Для оценки токсикологического профиля выбранных образцов микропузырьков забор крови у животных проводили через 3 и 24 часа после введения препаратов под анестезией изофлураном.

После взятия крови животных подвергали эвтаназии, после чего извлекали сердце, печень, селезёнку, лёгкие и почки для определения массы органов и проведения анализа распределения препарата вне организма.

Извлечённые органы исследовали *ex vivo* с использованием системы оптической визуализации IVIS Spectrum CT In Vivo Imaging System (PerkinElmer, Уолтем, штат Массачусетс, США) при длинах волн возбуждения/регистрации 640/700 нм с применением программного обеспечения Living Image версии 4.7.3.

Для каждой области интереса, соответствующей границам органов, определяли значения полной излучательной эффективности. Результаты для каждого органа представляли в виде суммарной излучательной эффективности с вычитанием среднего значения контрольной группы.

2.3.37 Статистическая обработка данных

Для каждого сополимера П(ВП–АК), комплексов БСА@П(ВП–АК) и БСА@ПАм, а также соответствующих микропузырьков готовили не менее

трёх независимых серий образцов. Каждую формулировку исследовали не менее трёх раз.

Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартного отклонения.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8. Для анализа применяли непарный t-критерий Стьюдента, однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с последующим пост-хок тестом Тьюки (Tukey HSD), а также двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) – в зависимости от типа сравниваемых данных и экспериментального дизайна.

Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Уровни статистической значимости обозначали следующим образом: (ns) – $p > 0,05$; () – $p < 0,05$; () – $p < 0,01$; () – $p < 0,001$; (****) – $p < 0,0001$.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем разделе представлены результаты исследования, посвященного получению белково-композитных микропузырьков на основе комплексов альбумина со стабилизирующими добавками различной природы, а также установлению взаимосвязи между составом комплексов, структурой межфазной оболочки, физико-химическими свойствами, устойчивостью и акустическими характеристиками получаемых микропузырьков. Кроме того, приведены результаты их биологических исследований *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*.

В главе 3.1 рассмотрены принципы формирования белково-полимерных комплексов и получения микропузырьков. Представлены подходы к разработке белково-композитных систем на основе БСА, амфифильных сополимеров П(ВП-АК) и полиамина (спермина), а также обосновано систематическое варьирование состава и структуры стабилизирующих добавок для последующего анализа их влияния на свойства микропузырьков.

Глава 3.2 посвящена анализу структурных параметров сополимеров П(ВП-АК) и их поведения в водной среде. Исследовано влияние молекулярной массы, концевой гидрофобной группы и состава цепи на самоорганизацию сополимеров, что позволило сформулировать предположения о факторах, определяющих формирование белково-полимерных комплексов.

В главе 3.3 исследовано формирование комплексов БСА@П(ВП-АК) и влияние их состава на физико-химические свойства. Представлены результаты определения оптимальных массовых соотношений компонентов, исследования межфазной активности, спектроскопического анализа, молекулярно-динамического моделирования и сравнительного анализа взаимодействия БСА с низкомолекулярными и макромолекулярными стабилизирующими добавками.

Глава 3.4 посвящена получению и исследованию белково-композитных микропузырьков. Представлены результаты оптимизации условий их

получения, анализа морфологических характеристик, исследования гибридной природы межфазной оболочки и структурной организации белка в ее составе.

В главе 3.5 исследована кавитационная динамика формирования предшественников микропузырьков и установлена ее взаимосвязь с составом белково-композитных систем.

В главе 3.6 представлены результаты исследования акустических характеристик белково-композитных микропузырьков *in vitro* и *in vivo*. Проанализирован нелинейный акустический отклик микропузырьков в модели сосуда, проведено сравнение образцов с макромолекулярными и низкомолекулярными стабилизирующими добавками, а также исследованы их эхоконтрастные свойства при эхокардиографии *in vivo*.

В главе 3.7 представлены результаты оценки биосовместимости белково-композитных микропузырьков *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*. Исследовано влияние микропузырьков на реологические свойства крови *ex vivo*, проведен анализ гематологических показателей после их введения *in vivo* и изучено биораспределение микропузырьков методом флуоресцентной томографии *ex vivo*.

3.1. Исследуемые белково-композитные системы

В соответствии с целью настоящей работы, для установления взаимосвязи между составом, физико-химическими параметрами, устойчивостью, временем циркуляции и эффективностью ультразвукового контрастирования микропузырьков была сформирована библиотека образцов на основе комплексов альбумина со стабилизирующими добавками различной природы. Исследуемые системы различались характером межмолекулярных взаимодействий, молекулярной массой стабилизирующих добавок, типом концевых групп и массовым соотношением компонентов.

В качестве белкового компонента использовали бычий сывороточный альбумин, структурно близкий к человеческому сывороточному альбумину

(75 % гомологии), что позволяет рассматривать его в качестве модели основного белка плазмы крови человека [231]. Белковые микропузырьки на основе альбумина исторически применялись в качестве ультразвуковых контрастных агентов, однако их устойчивость остается ограниченной. В настоящей работе было выдвинуто и экспериментально подтверждено положение о возможности повышения стабильности микропузырьков на основе альбумина за счет формирования его комплексов со стабилизирующими добавками различной природы.

В качестве стабилизирующих добавок использовали два типа соединений, различавшихся молекулярной природой и механизмом взаимодействия с белком: макромолекулярный амфифильный сополимер П(ВП-АК) и низкомолекулярный полиамин спермин. В качестве контрольной системы использовали микропузырьки с немодифицированной белковой оболочкой на основе БСА. Общая схема исследуемых систем и получения микропузырьков представлена на рисунке 3.1.

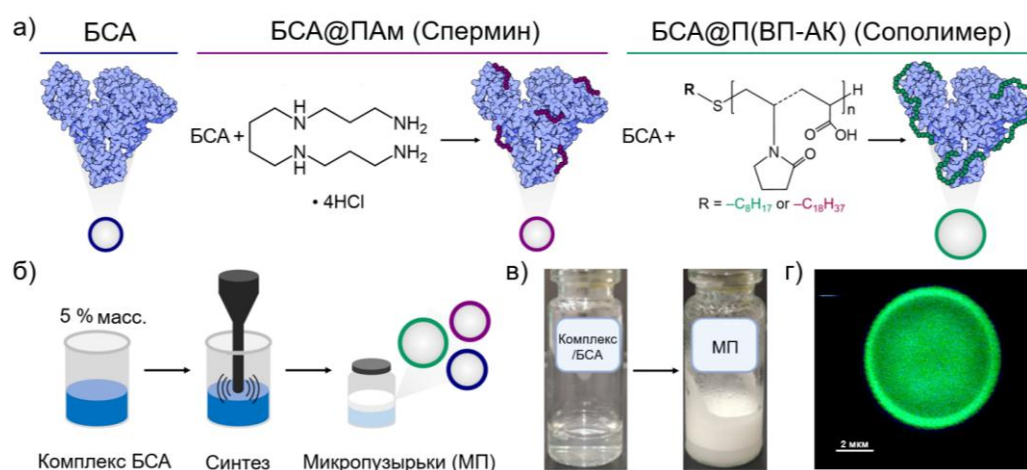


Рисунок 3.1. Исследуемые белково-композитные системы и схема получения микропузырьков: а – схематическое представление исследуемых систем: микропузырьков на основе бычьего сывороточного альбумина (БСА, 66 кДа), комплексов БСА с низкомолекулярным полиамином спермином (БСА@ПАм, мольное соотношение 3:57) и комплексов БСА с амфифильными сополимерами П(ВП-АК), различавшимися молекулярной

массой M_n и строением концевых меркаптановых групп (БСА@П(ВП-АК)); б – схема получения микропузырьков методом ультразвуковой обработки при суммарной концентрации белка или комплекса 5 % (мас./об.); в – фотографии пробирок, иллюстрирующие основные этапы получения микропузырьков; г – изображение микропузырька, полученное методом микроскопии времени жизни флуоресценции.

В качестве макромолекулярной стабилизирующей добавки использовали амфифильный сополимер N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты П(ВП-АК), выбор которого был обусловлен возможностью направленного изменения его молекулярной массы, состава цепи и типа концевой гидрофобной группы. Поливинилпирролидон характеризуется биосовместимостью и химической устойчивостью, а при молекулярной массе менее 25 кДа способен выводиться почками [232]. Наличие звеньев акриловой кислоты обеспечивает отрицательный заряд полимерной цепи и создает условия для электростатического взаимодействия с положительно заряженными участками молекулы альбумина. Амфифильное строение сополимера также способствует его самоорганизации в водной среде и проявлению межфазной активности.

Для исследования влияния молекулярных параметров полимера была сформирована библиотека сополимеров П(ВП-АК), различавшихся среднечисловой молекулярной массой M_n и типом концевой гидрофобной группы. Для каждого сополимера дополнительно варьировали массовое соотношение БСА и П(ВП-АК), что позволило сформировать библиотеку белково-полимерных комплексов с различными физико-химическими характеристиками.

В качестве низкомолекулярной стабилизирующей добавки использовали природный полиамин спермин, участвующий в регуляции клеточного роста и воспалительных процессов [233]. Спермин способен образовывать с альбумином преимущественно электростатические

комплексы, оказывая влияние на его структурные и динамические характеристики [227]. Использование данной системы позволило сопоставить влияние макромолекулярной и низкомолекулярной стабилизирующих добавок на физико-химические параметры, устойчивость, акустические характеристики и биологические свойства белково-композитных микропузырьков.

Таким образом, в работе была сформирована библиотека образцов, включавшая микропузырьки на основе немодифицированного БСА, комплексов БСА со спермином и комплексов БСА с амфифильными сополимерами П(ВП-АК), различавшимися молекулярной массой M_n , типом концевых групп и массовым соотношением компонентов. В последующих разделах последовательно рассмотрены свойства сополимеров П(ВП-АК), особенности формирования белково-полимерных комплексов, получение микропузырьков, их физико-химические параметры, устойчивость, акустические характеристики и биологические свойства.

3.2. Синтез, исследование структурных параметров сополимеров П(ВП-АК) и их физико-химических свойств

Сополимер П(ВП-АК) был взят как модельная амфифильная макромолекулярная система, структура и свойства которой определяются длиной цепи и природой концевой гидрофобной группы. Именно эти параметры задают характер межмолекулярных взаимодействий в объёме раствора, распределение макромолекул между объёмной фазой и межфазной границей и, как следствие, условия последующего комплексообразования с альбумином. Такой анализ позволяет установить физико-химические предпосылки формирования системы «БСА@П(ВП-АК) оболочка и газовое ядро» и корректно интерпретировать выявленные зависимости между составом системы, структурой формирующейся оболочки и функциональными характеристиками микропузырьков.

3.2.1. Амфифильный сополимер П(ВП-АК) с концевой октадецильной группой (18 кДа)

В качестве исходной модели для построения гибридной оболочки был выбран амфифильный сополимер N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты с концевой n-октадецилтиогруппой (П(ВП-АК), С18) и среднечисловой молекулярной массой M_n 18 кДа. Данный сополимер был использован при формировании первой серии белково-полимерных микропузырьков и послужил отправной точкой для последующего варьирования структурных параметров полимерной системы.

Введение звеньев акриловой кислоты в структуру поливинилпирролидона обеспечило наличие ионогенных карбоксильных групп, способных к электростатическому взаимодействию с положительно заряженными аминокислотными остатками альбумина (лизин, аргинин). Концевая n-октадецилтиогруппа, напротив, формирует выраженный гидрофобный фрагмент, способный участвовать в гидрофобных взаимодействиях с неполярными участками белковой глобулы (аланин, валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин). Таким образом, сополимер сочетает два типа взаимодействий – электростатические и гидрофобные, что способствует формированию устойчивого белково-полимерного комплекса.

Сополимер был получен методом радикальной сополимеризации N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты в присутствии инициатора 2,2'-азобис(2-метилпропионитрила) и n-октадекантиола в качестве регулятора длины цепи. По данным кислотно-основного титрования мольная доля звеньев акриловой кислоты в цепи составила 9,7 мол.% (рисунок 3.2а). Среднечисловая молекулярная масса M_n , определенная методом анализа концевых групп, составила 18 кДа. Структура сополимера подтверждена методом двумерной гетероядерной одноквантовой корреляционной ЯМР-спектроскопии (HSQC), позволившей идентифицировать сигналы, соответствующие протонам и атомам углерода звеньев N-винил-2-

пирролидона, акриловой кислоты и концевой гидрофобной группы. В спектре ЯМР ^{13}C регистрировались сигналы карбонильных атомов углерода амидной и карбоксильной групп при 173,5 и 175 м.д. соответственно, что соответствует ожидаемой химической структуре сополимера (рисунок 3.2б).

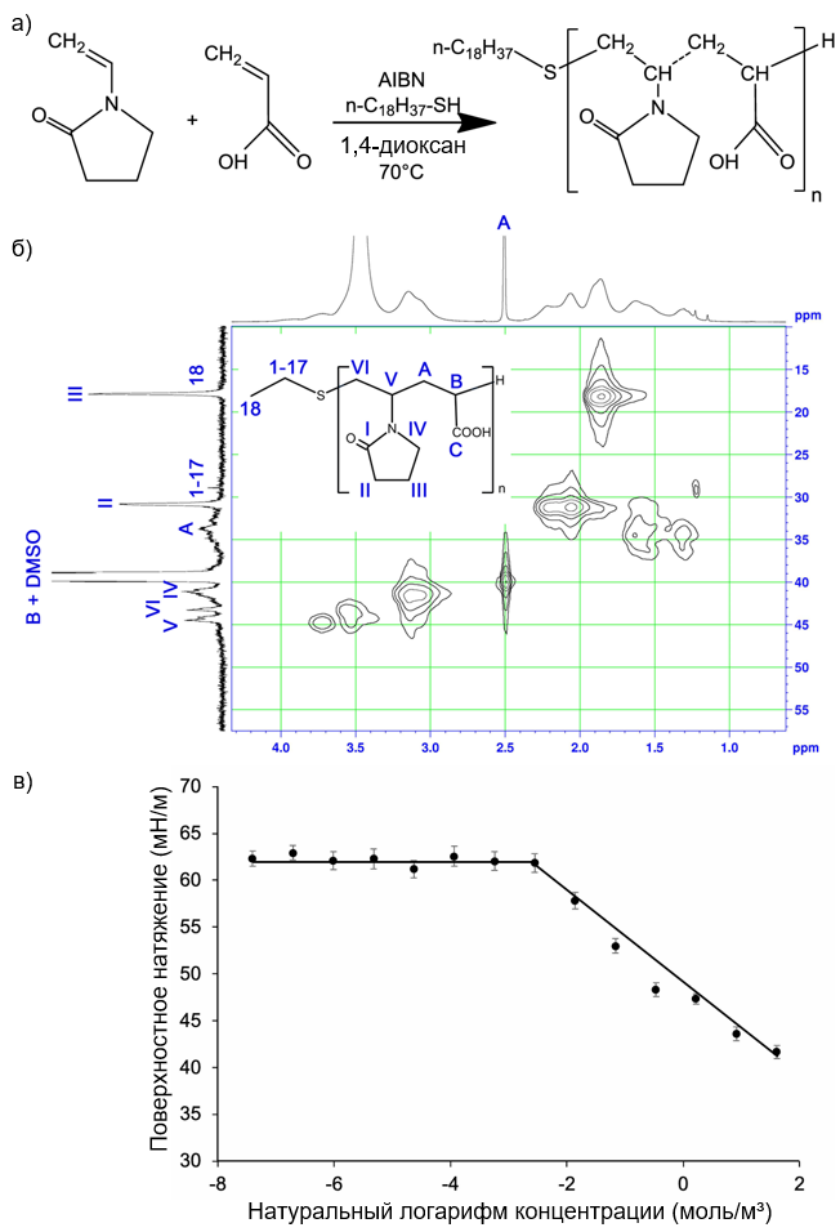


Рисунок 3.2. Синтез и характеристика амфифильного сополимера П(ВП-АК) с концевой n-октадецилтиогруппой ($M_n = 18$ кДа). а) Схема радикальной сополимеризации N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты в присутствии инициатора 2,2'-азобис(2-метилпропионитрила) (AIBN) и регулятора длины цепи n-октадекантиола ($n\text{-C}_{17}\text{H}_{37}\text{-SH}$) в среде 1,4-диоксана при 70 °С. б) Двумерный гетероядерный спектр ЯМР типа HSQC сополимера

П(ВП-АК). в) Изотерма поверхностного натяжения водного раствора П(ВП-АК) ($M_n = 18$ кДа) в координатах «поверхностное натяжение – натуральный логарифм концентрации».

Амфифильное строение П(ВП-АК) с концевой С18-группой определяет его межфазную активность и склонность к самоорганизации в водной среде. По данным тензиметрии сополимер снижает поверхностное натяжение на границе газ–жидкость, что свидетельствует о накоплении макромолекул на межфазной границе (рисунок 3.2в). Критическая концентрация агрегации составляет $7,8 \times 10^{-2}$, что соответствует началу образования гидрофобных агрегатов в объеме раствора. По данным ДСР наблюдалось образование частиц со средним гидродинамическим диаметром около 284 нм.

Выявленные особенности поведения сополимера с M_n 18 кДа и концевой С18-группой свидетельствуют о его выраженной склонности к гидрофобной самоорганизации. Полученные результаты послужили основой для последующего исследования формирования белково-полимерных комплексов и анализа влияния молекулярной массы и строения концевой гидрофобной группы на физико-химические параметры сополимеров и характеристики получаемых микропузырьков.

3.2.2 Синтез серии сополимеров П(ВП-АК) и анализ их самоорганизации в водной среде

Полученные данные для сополимера П(ВП-АК) с концевой n-октадецилтиогруппой ($M_n = 18$ кДа) продемонстрировали выраженную межфазную активность и склонность к гидрофобной самоорганизации, что обеспечило эффективное формирование гибридной оболочки микропузырьков. Вместе с тем использование единственного сополимера не позволяет установить количественные закономерности влияния длины макромолекулярной цепи и природы концевой группы на характер самоорганизации и межфазного поведения системы. (рис. 3.3)

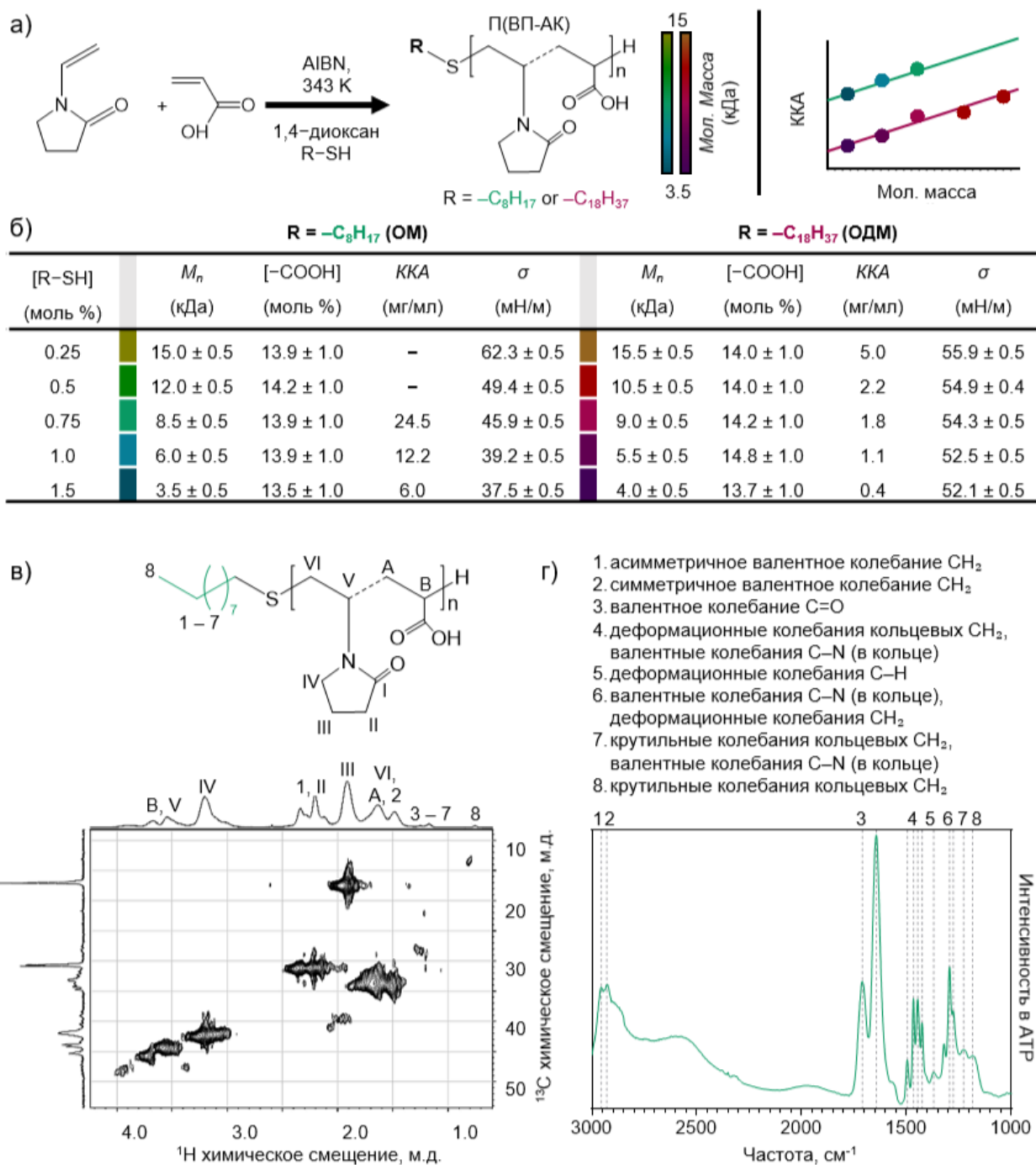


Рисунок 3.3. Синтез и характеристика амфифильных сополимеров П(ВП–АК) с различной молекулярной массой и концевыми алкильными группами. а) Схема радикальной сополимеризации N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты с использованием AIBN и регуляторов длины цепи: n-октилмеркаптана (ОМ, C_8) и n-октадецилмеркаптана (ОДМ, C_{18}). Показана зависимость критической концентрации агрегации от числовой средней молекулярной массы и типа концевой группы. б) Молекулярная масса,

содержание карбоксильных групп, критическая концентрация агрегации и поверхностное натяжение растворов сополимеров. в) Двумерный гетероядерный ЯМР спектр HSQC сополимера П(ВП–АК) ОМ 8,5 кДа. г) Спектр, полученный методом ИК-Фурье спектроскопии с насадкой НПВО, для сополимера П(ВП–АК) ОМ 8,5 кДа.

Для установления количественных закономерностей влияния молекулярной массы и длины концевой гидрофобного фрагмента на поведение сополимера в растворе была получена серия амфифильных сополимеров П(ВП-АК), различавшихся среднечисловой молекулярной массой M_n и типом концевой группы (рисунок 3.3а, б). Сополимеры получали методом радикальной сополимеризации N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты в присутствии инициатора 2,2'-азобис(2-метилпропионитрила) и тиолсодержащих n-алкилмеркаптанов – n-октилмеркаптана (ОМ, C_8) и n-октадецилмеркаптана (ОДМ, C_{18}). Данные соединения выполняли функцию регуляторов длины цепи и определяли строение концевой гидрофобного фрагмента сополимеров.

В результате были получены сополимеры со значениями M_n 3,5; 6; 8,5; 12 и 15 кДа для обеих серий – ОМ и ОДМ. Содержание звеньев акриловой кислоты во всех образцах составило 14 мол. %, что превышало соответствующее значение для исходного сополимера с M_n 18 кДа, равное 9,7 мол. %. Увеличение доли карбоксильных групп было направлено на усиление потенциального электростатического взаимодействия с альбумином, поскольку одна глобула БСА способна взаимодействовать с несколькими десятками карбоксильных групп.

Структура полученных сополимеров была подтверждена методами одно- и двумерной ЯМР-спектроскопии, а также методом ИК-Фурье спектроскопии. Типичный двумерный спектр ЯМР HSQC сополимера П(ВП-АК) ОМ с M_n 8,5 кДа представлен на рисунке 3.3в. В спектре регистрировались корреляционные сигналы, соответствующие протонам и атомам углерода звеньев N-винил-2-пирролидона, акриловой кислоты и

концевого алкильного фрагмента, что подтвердило химическую структуру сополимера. ИК-Фурье спектр данного образца представлен на рисунке 3.3г.

Таблица 3.1. Отнесение полос поглощения в ИК-Фурье спектре сополимера П(ВП-АК) ОМ с M_n 8,5 кДа.

Положение полосы (см^{-1})	Интенсивность (отн. ед.)	Соотнесение полосы
1185,0	0,011	Крутильные колебания CH_2 (в цикле) [234]
1227,8	0,013	Крутильные колебания CH_2 (в цикле), валентные колебания $\text{C}-\text{N}$ (в цикле) [234]
1277,2	0,021	Валентные колебания $\text{C}-\text{N}$ (в цикле), маятниковые колебания CH_2 [234]
1294,6	0,031	Валентные колебания $\text{C}-\text{N}$ (в цикле), маятниковые колебания CH_2 [234]
1370,2	0,008	Деформационные колебания $\text{C}-\text{H}$ [235]
1425,4	0,018	Маятниковые колебания CH_2 (в цикле), валентные колебания $\text{C}-\text{N}$ (в цикле) [234]
1446,1	0,024	Маятниковые колебания CH_2 (в цикле), валентные колебания $\text{C}-\text{N}$ (в цикле) [234]
1466,7	0,024	Маятниковые колебания CH_2 (в цикле), валентные колебания $\text{C}-\text{N}$ (в цикле) [234]
1496,0	0,010	Маятниковые колебания CH_2 (в цикле), валентные колебания $\text{C}-\text{N}$ (в цикле) [234]
1643,8	0,059	Валентные колебания $\text{C}=\text{O}$ [236, 237]

1710,9	0,027	Валентные колебания C=O [236, 237]
2929,8	0,027	Симметричные валентные колебания CH ₂ [234]
2955,5	0,026	Асимметричные валентные колебания CH ₂ [234]

ИК-Фурье спектры сополимеров (рисунок 3.3г) регистрировали для их растворов. В спектрах отчетливо наблюдались полосы поглощения, соответствующие валентным колебаниям карбонильных групп амидного фрагмента пирролидинового цикла (C=O), карбоксильных групп акриловой кислоты, а также связей C–N и C–H, характерных для основной полимерной цепи и концевой алкильного фрагмента. Совокупность полученных спектральных данных подтверждает присутствие обоих мономерных звеньев и сохранность концевой гидрофобной группы в структуре сополимера (таблица 3.1).

Сочетание длины макромолекулярной цепи и строения концевой гидрофобной группы определяет склонность сополимера к самоорганизации в водной среде. Межфазное поведение амфифильных систем количественно описывается зависимостью поверхностного натяжения от концентрации и связано с поверхностным избытком компонента согласно уравнению Гиббса:

$$d\sigma = - \sum \Gamma_i d\mu_i \quad (3.1)$$

где σ – поверхностное натяжение; Γ_i – поверхностный избыток i -го компонента; μ_i – химический потенциал i -го компонента.

По данным тензиметрии для сополимеров с концевой C18-группой значения критической концентрации агрегации оказались существенно ниже по сравнению с серией C8 при сопоставимых значениях M_n , что свидетельствует о более выраженной гидрофобной составляющей и повышенной склонности к самоорганизации в объеме раствора. При увеличении M_n в пределах каждой серии наблюдалось повышение

критической концентрации агрегации, что указывает на снижение относительного вклада концевой гидрофобного фрагмента по мере увеличения длины макромолекулярной цепи (рисунок 3.4а, б).

Для сополимеров с концевой группой ОМ (C8) и M_n 12 и 15 кДа образование устойчивых дисперсных структур в исследованном диапазоне концентраций не наблюдалось, что проявлялось отсутствием четко выраженного перегиба на изотермах поверхностного натяжения. В то же время сополимеры с концевой группой ОДМ (C18) формировали частицы с характерным гидродинамическим диаметром порядка нескольких сотен нанометров (рисунок 3.3а).

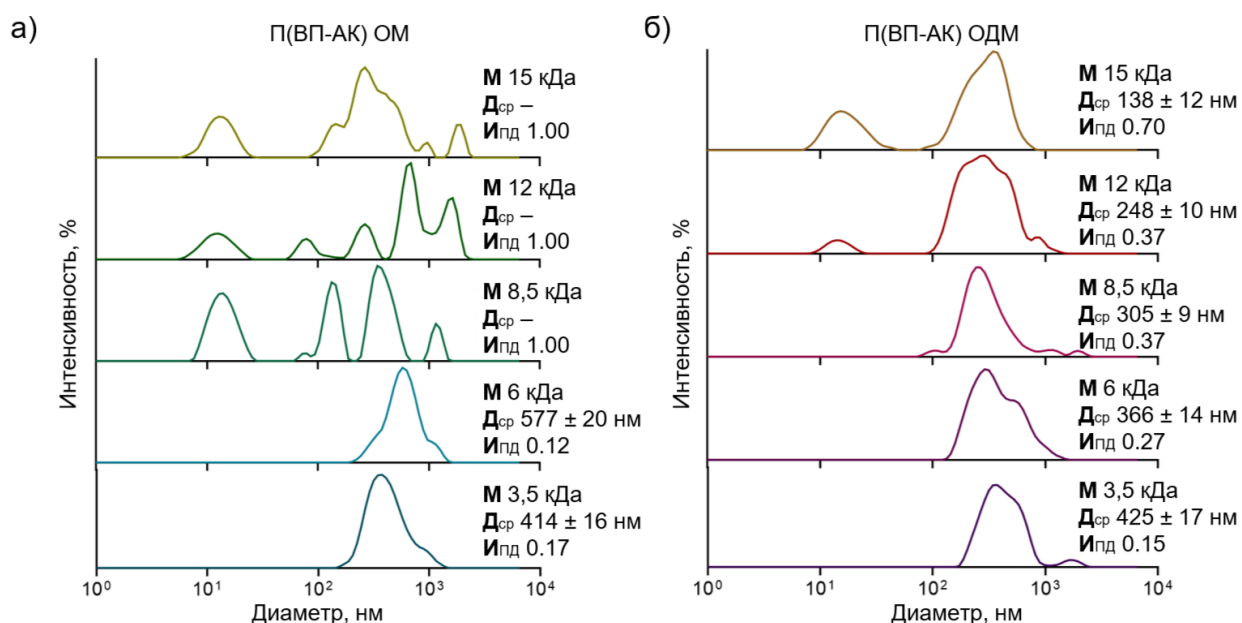


Рисунок 3.4. Распределение гидродинамического диаметра частиц, образуемых сополимерами П(ВП-АК) с различными значениями M_n , по данным ДСР при концентрации 20 мг/мл в воде: а) сополимеры с концевой *n*-октилтиогруппой (ОМ, C₈); б) сополимеры с концевой *n*-октадецилтиогруппой (ОДМ, C₁₈). На графиках представлены распределения по интенсивности рассеяния в зависимости от гидродинамического диаметра частиц, а также значения среднего гидродинамического диаметра (нм) и индекса полидисперсности (Ипд).

Дополнительный анализ методом ДСР показал, что сополимеры обеих серий с M_n 3,5 и 6 кДа образовывали дисперсные структуры с относительно узким распределением размеров. При увеличении M_n различия между сериями становились более выраженными: сополимеры с концевой группой C18 сохраняли способность к образованию устойчивых частиц, тогда как аналоги с концевой группой C8 характеризовались широким распределением размеров и высокой полидисперсностью, что свидетельствует об отсутствии устойчивой самоорганизации в объеме раствора (рис. 3.4а, б).

Сопоставление результатов тензиметрии и ДСР позволило заключить, что увеличение длины концевого гидрофобного фрагмента усиливает склонность сополимеров к самоорганизации в растворе, тогда как увеличение M_n снижает относительный вклад концевой группы в образование дисперсных структур. Иными словами, при небольших значениях M_n поведение системы в большей степени определяется гидрофобным фрагментом, тогда как с увеличением молекулярной массы возрастает влияние гидрофильной части макромолекулы.

Таким образом, полученная библиотека сополимеров позволила установить, что способность П(ВП-АК) к самоорганизации и снижению поверхностного натяжения определяется совместным влиянием M_n и длины концевого углеводородного фрагмента. Эти параметры определяют распределение макромолекул между объемом раствора и межфазной границей и, следовательно, оказывают влияние на формирование белково-полимерных комплексов и оболочки микропузырьков.

3.3 Формирование белково-композитных комплексов БСА и влияние состава на их свойства

В данном подразделе рассмотрены условия комплексообразования в системе БСА@П(ВП-АК) с концевой октадецильной группой и среднечисловой молекулярной массой M_n 18 кДа. Указанный сополимер был выбран в качестве модельного объекта для оптимизации массового

соотношения компонентов, поскольку сочетает выраженную амфифильность и достаточную длину полимерной цепи. Такой подход позволяет использовать данную систему в качестве модели для анализа взаимосвязи между составом белково-полимерного комплекса, его организацией в растворе и способностью к формированию межфазной оболочки микропузырьков.

Комплексы БСА@П(ВП-АК) ОДМ предназначались для использования в качестве материала гибридной оболочки микропузырьков. В качестве исходной концентрации раствора была выбрана массовая доля 5 % (мас./об.), соответствующая диапазону, традиционно применяемому при получении альбуминовых микропузырьков. При этом первоначально концентрацию БСА поддерживали на уровне 5 % (мас./об.), а сополимер вводили в количествах, обеспечивавших массовое соотношение белок:сополимер от 15:1 до 1:1.

Следует отметить, что при таком подходе суммарная концентрация комплекса превышала 5 % (мас./об.) и возрастала до 5,33–10 % (мас./об.) в зависимости от массового соотношения компонентов. Растворы комплекса БСА@П(ВП-АК) ОДМ, полученные в этих условиях, характеризовались повышенной вязкостью и склонностью к образованию эмульсионных и гелеобразных структур. При ультразвуковой обработке (соникации) формирование микропузырьков не происходило.

Наблюдаемое поведение свидетельствует о том, что при повышенной суммарной концентрации в системе БСА@П(ВП-АК) ОДМ с M_n 18 кДа усиливаются межмолекулярные взаимодействия, включая гидрофобную ассоциацию цепей П(ВП-АК), что приводит к укрупнению полимерных агрегатов и вовлечению в них молекул альбумина. В результате образуются протяженные агрегаты с ограниченной подвижностью, затрудняющие перераспределение комплекса на формирующейся межфазной границе при ультразвуковой обработке. Это делает невозможным образование стабильной оболочки микропузырьков.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что структурное состояние белково-полимерного комплекса и его способность к адсорбции на

межфазной границе определяются не только массовым соотношением компонентов, но и их суммарной концентрацией.

В дальнейшем была реализована стратегия, согласно которой массовая доля 5% (мас./об.) относилась к суммарной концентрации уже сформированного белково-полимерного комплекса, а не к одному из его компонентов. Для этого растворы БСА и П(ВП-АК) ОДМ готовили отдельно, нагревали до 50 °С и смешивали при той же температуре с выдержкой в течение 1 ч. Повышение температуры до 50 °С увеличивает подвижность макромолекулярных цепей и снижает поверхностное натяжение раствора, что способствует формированию однородных белково-полимерных комплексов и предотвращает их укрупнение.

В указанных условиях удавалось воспроизводимо получать однородные растворы комплекса БСА@П(ВП-АК) ОДМ в диапазоне массовых соотношений белок:сополимер от 15:1 до 1:15 при сохранении суммарной концентрации 5% (мас./об.). Растворы сохраняли текучесть, не демонстрировали признаков гелеобразования и были пригодны для последующего получения микропузырьков.

Таким образом, для системы БСА@П(ВП-АК) ОДМ поддержание суммарной концентрации комплекса на уровне 5% (мас./об.) является необходимым условием получения однородного раствора. Превышение данного значения сопровождается усилением ассоциации сополимера и переходом системы в агрегированное состояние, что препятствует получению микропузырьков. Тем самым установлено, что контроль суммарной концентрации и массового соотношения компонентов определяет структурное состояние белково-полимерных комплексов и их способность к формированию устойчивой межфазной оболочки микропузырьков.

3.3.1. Межфазная активность комплексов БСА@П(ВП-АК) и обоснование выбора оптимальных массовых соотношений

После установления оптимального концентрационного режима формирования комплекса БСА@П(ВП-АК) ОДМ (Мн 18 кДа) (рисунок 2.5а) была проведена оценка его межфазной активности, определяющей способность системы к образованию и стабилизации микропузырьков. Межфазная активность позволяет установить взаимосвязь между составом белково-полимерного комплекса и его свойствами при формировании межфазной оболочки микропузырьков. Снижение поверхностного натяжения на границе газ–жидкость является необходимым условием образования новой межфазной поверхности при ультразвуковой обработке и формирования устойчивой гибридной оболочки.

Как было показано ранее (уравнение 3.1), снижение поверхностного натяжения сопровождается увеличением поверхностного избытка компонентов на межфазной границе. Поэтому уменьшение поверхностного натяжения в растворах комплекса БСА@П(ВП-АК) свидетельствует об эффективной адсорбции белково-полимерных ассоциатов на границе газ–жидкость.

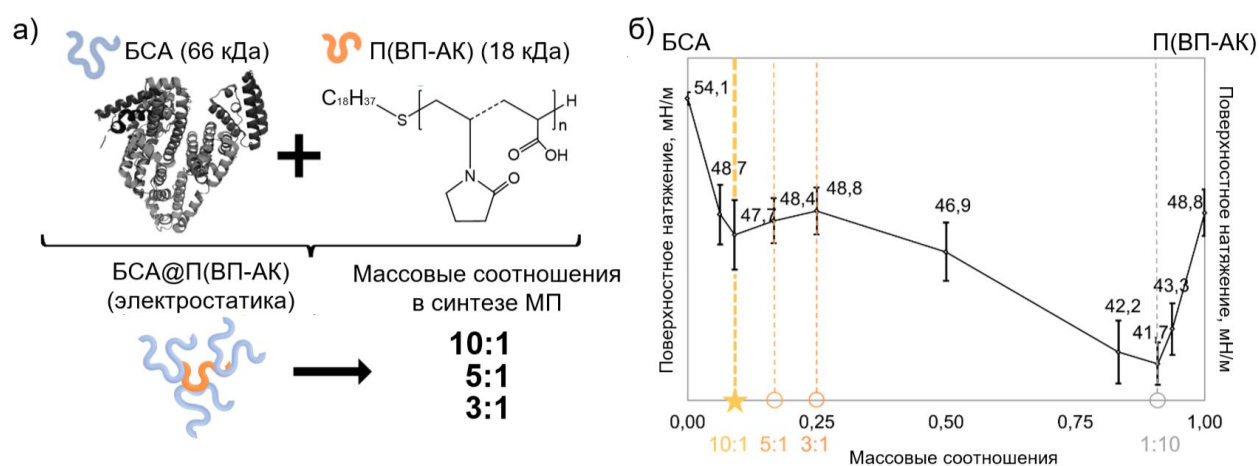


Рисунок 3.5. Формирование белково-полимерных комплексов БСА@П(ВП-АК) и их межфазные свойства: а – схематическое изображение компонентов, участвующих в формировании белково-полимерного комплекса БСА@П(ВП-АК); альбумин и амфифильный сополимер образуют комплекс

преимущественно за счет электростатических взаимодействий; б – тензиметрические данные для комплексов с различными массовыми соотношениями БСА:П(ВП-АК). Желтой звездой отмечено соотношение 10:1, точками – соотношения 5:1, 3:1 и 1:10.

Зависимость поверхностного натяжения от массового соотношения компонентов представлена на рисунке 3.5б. Были исследованы системы с массовыми соотношениями БСА:П(ВП-АК) 15:1, 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:5, 1:10 и 1:15 при суммарной концентрации комплекса 5% (мас./об.). Полученная зависимость имела нелинейный характер и характеризовалась наличием двух минимумов: локального при соотношении 10:1 и более выраженного при соотношении 1:10.

Несмотря на более низкое поверхностное натяжение при соотношении 1:10, использование данного раствора для получения микропузырьков сопровождалось образованием в объеме раствора коллоидных частиц диаметром около 100–200 нм. Появление таких частиц свидетельствует о преимущественном распределении сополимера в объеме раствора и ассоциации белково-полимерных комплексов при избытке полимерного компонента. Ассоциация комплексов снижает долю частиц, способных быстро адсорбироваться на формирующейся поверхности пузырька, и способствует агрегации газовых включений. Полученные результаты свидетельствуют о том, что межфазная активность системы определяется не только величиной поверхностного натяжения, но и состоянием комплекса в растворе, что согласуется с установленной ранее зависимостью между его составом и степенью агрегации.

В отличие от системы с соотношением 1:10, при соотношении 10:1, соответствующем локальному минимуму поверхностного натяжения, признаки агрегации в объеме раствора отсутствовали, а микропузырьки получали воспроизводимо. Массовые соотношения 10:1, 5:1 и 3:1 обеспечивали снижение поверхностного натяжения без перехода системы в

агрегированное состояние и были выбраны для дальнейшего исследования свойств микропузырьков с гибридной оболочкой.

Устойчивость полученных микропузырьков определяется величиной избыточного давления на криволинейной межфазной границе, описываемого уравнением Юнга–Лапласа:

$$\Delta P = \frac{2\sigma}{R} \quad (3.2)$$

где ΔP – избыточное давление внутри пузырька; σ – поверхностное натяжение; R – радиус пузырька.

Снижение поверхностного натяжения приводит к уменьшению избыточного давления и, следовательно, снижает термодинамическую движущую силу растворения газового ядра.

Кинетика растворения газа дополнительно определяется диффузионными процессами и в первом приближении описывается уравнением Эпштейна–Плессета:

$$\frac{dR}{dt} = -\frac{D(c_s - c_\infty)}{\rho_g R} \quad (3.3)$$

где D – коэффициент диффузии газа; c_s – концентрация растворенного газа у поверхности пузырька; c_∞ – концентрация растворенного газа в объеме жидкости; ρ_g – плотность газа.

Поскольку внутреннее давление пузырька связано с поверхностным натяжением, его снижение уменьшает движущую силу диффузионного растворения газа и способствует увеличению времени существования микропузырьков. Таким образом, поверхностное натяжение влияет как на формирование межфазной оболочки, так и на устойчивость полученных микропузырьков.

Анализ тензиметрических данных (рис. 3.5б) показал, что выбор массовых соотношений БСА:П(ВП-АК) для получения микропузырьков определяется не минимальным значением поверхностного натяжения, а сочетанием межфазной активности и устойчивости комплекса к агрегации в

объеме раствора. Диапазон массовых соотношений от 10:1 до 3:1 обеспечивал адсорбцию комплекса на границе газ–жидкость при сохранении дисперсного состояния раствора, что способствовало воспроизводимому получению и повышению устойчивости микропузырьков.

3.3.2. Спектроскопическая характеристика модельного комплекса БСА@П(ВП-АК) ОДМ 18 кДа

Структура и природа взаимодействия компонентов в комплексе БСА@П(ВП-АК) были исследованы методами матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетной масс-спектрометрией (MALDI-TOF) и ИК-Фурье спектроскопии. (рис 3.6) Проведенные исследования были направлены на установление взаимосвязи между молекулярной природой взаимодействия компонентов, структурной организацией белково-полимерного комплекса и его физико-химическими свойствами, определяющими формирование межфазной оболочки микропузырьков.

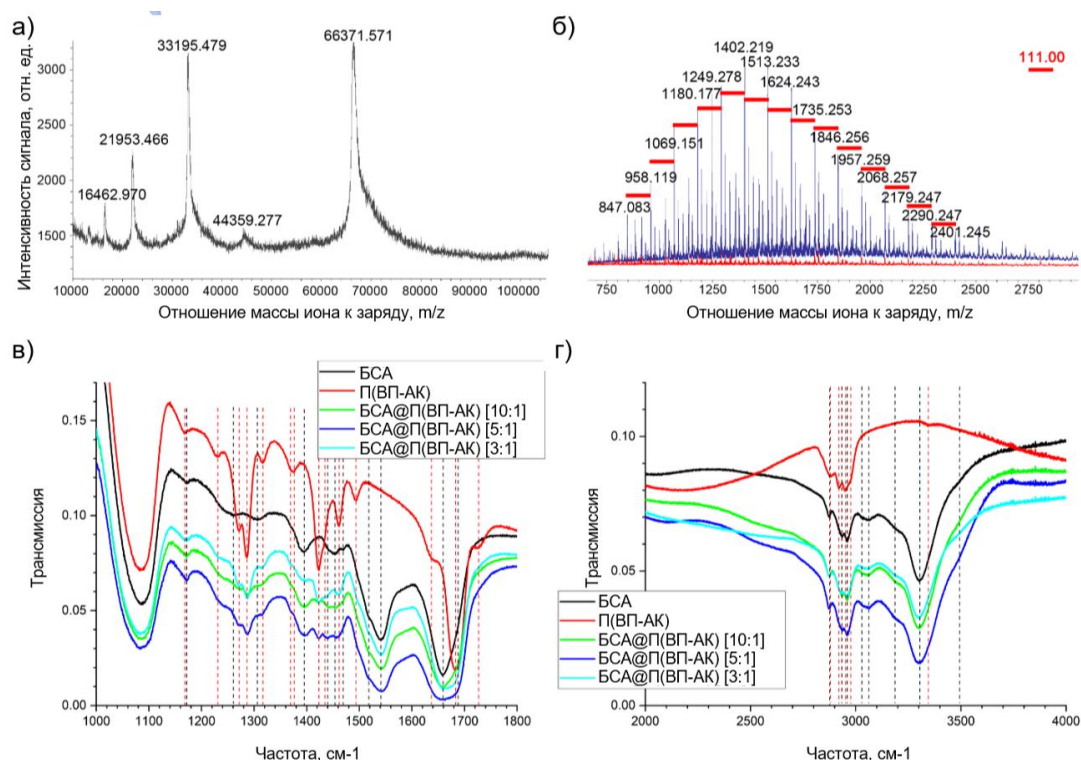


Рисунок 3.6. Спектроскопическая характеристика комплекса БСА@П(ВП-АК): а) масс-спектр комплекса БСА@П(ВП-АК), зарегистрированный

методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетной масс-спектрометрией (MALDI-TOF) в линейном режиме; б) масс-спектры сополимера П(ВП-АК) и комплекса БСА@П(ВП-АК), зарегистрированные в рефлекторном режиме; показана серия сигналов с интервалом отношения массы к заряду около 111, соответствующим повторяющемуся звену сополимера; в) ИК-Фурье спектры пропускания БСА, П(ВП-АК) и их комплексов с массовыми соотношениями 10:1, 5:1 и 3:1 в диапазоне 1000–1800 см⁻¹; г) ИК-Фурье спектры пропускания тех же образцов в диапазоне 2000–4000 см⁻¹. Вертикальные пунктирные линии соответствуют положениям характеристических полос БСА и П(ВП-АК). Спектроскопическая характеристика комплекса БСА@П(ВП-АК).

Масс-спектры комплекса БСА@П(ВП-АК) регистрировали в широком диапазоне отношений массы к заряду в линейном режиме (рисунок 3.6а). В спектрах наблюдались сигналы, соответствующие молекуле альбумина, а также дополнительные сигналы, обусловленные присутствием белковых примесей в коммерческом препарате БСА, что согласуется с литературными данными.

При регистрации спектров в области низких значений отношения массы к заряду в рефлекторном режиме (рис. 3.6б) наблюдалась серия сигналов с интервалом около 111 Да, соответствующим молекулярной массе повторяющегося звена сополимера П(ВП-АК). Совпадение данного интервала с молекулярной массой повторяющегося звена свидетельствует о высвобождении полимерных фрагментов вследствие разрушения белково-полимерного комплекса в процессе лазерной десорбции/ионизации из матрицы 2,5-дигидроксibenзойной кислоты.

Отсутствие сигналов, соответствующих ковалентно связанным белково-полимерным структурам, подтверждает нековалентную природу взаимодействия компонентов комплекса. Таким образом, данные MALDI-TOF свидетельствуют о том, что комплекс БСА@П(ВП-АК) представляет собой

супрамолекулярную систему, стабилизированную преимущественно электростатическими, водородными и гидрофобными взаимодействиями.

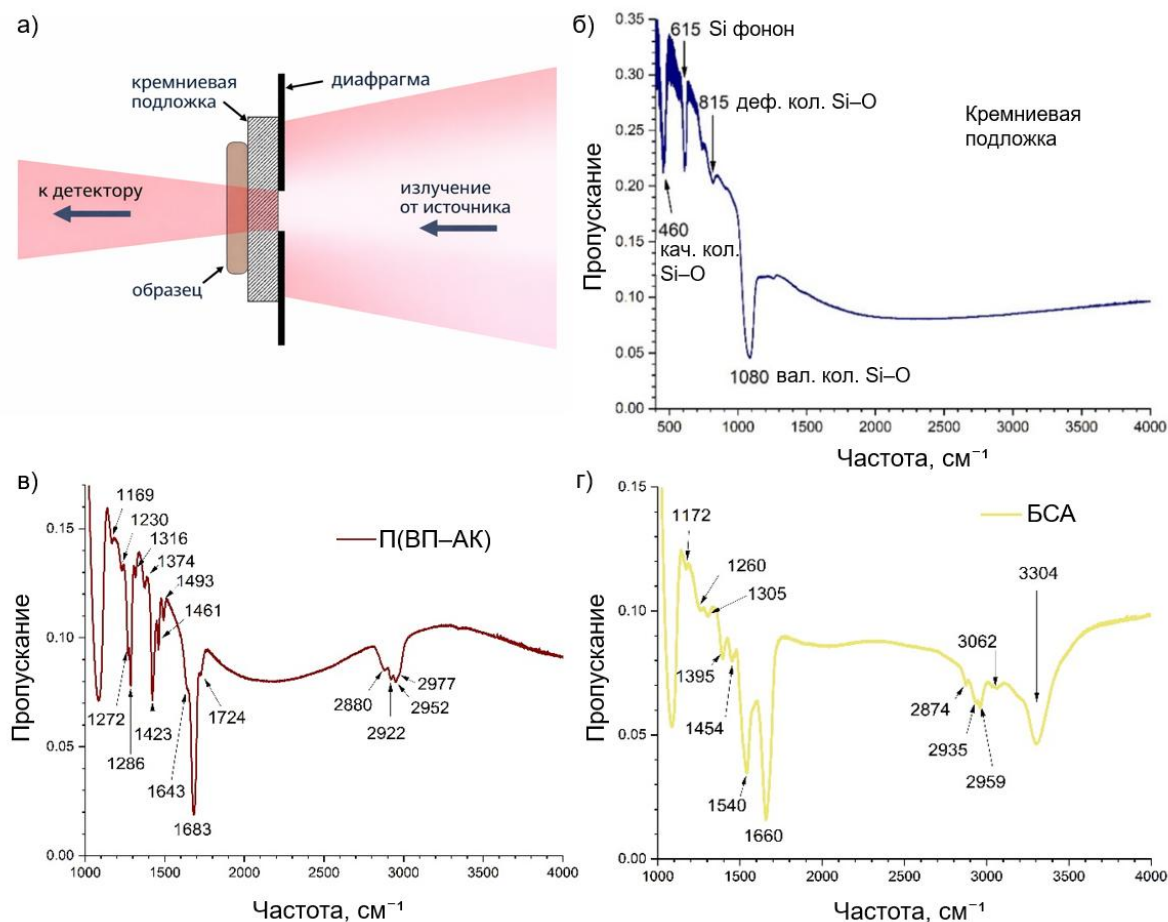


Рисунок 3.7. Схема размещения образца и ИК-Фурье спектры пропускания подложки и исходных компонентов системы БСА@П(ВП-АК): а) схема размещения образца на диафрагме внутри инфракрасного спектрометра; б) ИК-Фурье спектр пропускания кремниевой подложки Si/SiO₂; в) ИК-Фурье спектр пропускания сополимера П(ВП-АК), нанесенного на подложку Si/SiO₂; г) ИК-Фурье спектр пропускания БСА, нанесенного на подложку Si/SiO₂.

Анализ ИК-Фурье спектров исходных компонентов (рис. 3.7в, г) показал наличие характеристических полос БСА и П(ВП-АК), локализованных в двух основных спектральных диапазонах: 1150–1750 см^{-1} и 2850–3350 см^{-1} . Первая область включает амидные полосы белка (амид I и амид II), а также колебания карбоксильных и лактамных групп сополимера, тогда как вторая соответствует валентным колебаниям C–N и O–H.

Анализ спектров комплексов БСА@П(ВП-АК) (рис. 3.6в, г) показал, что при уменьшении массового соотношения БСА:П(ВП-АК) от 10:1 до 3:1 форма спектра постепенно изменяется от спектра, характерного преимущественно для БСА, к спектру, характерному преимущественно для П(ВП-АК). При этом во всех образцах сохранялись характеристические полосы как альбумина, так и сополимера, а их относительная интенсивность изменялась в соответствии с составом комплекса. Появления новых полос или существенных сдвигов частот, свидетельствующих об образовании ковалентных связей, не наблюдалось.

Совокупность результатов ИК-Фурье спектроскопии и MALDI-TOF свидетельствует о том, что взаимодействие между БСА и П(ВП-АК) носит нековалентный характер и реализуется преимущественно за счет электростатических, водородных и гидрофобных взаимодействий. Полученные данные также указывают, что белково-полимерные комплексы формируются в объеме раствора до стадии ультразвуковой обработки, а изменение массового соотношения компонентов приводит к изменению их молекулярной организации без образования новых ковалентных связей.

3.3.3. Рамановская спектроскопия комплексов БСА@П(ВП-АК) с использованием полых микроструктурированных оптических волноводов

Дополнительная характеристика белково-полимерных комплексов БСА@П(ВП-АК) была проведена методом рамановской спектроскопии с использованием полых микроструктурированных оптических волноводов (ПМОВ). Выбор данного подхода был обусловлен особенностями исследуемых систем. Белково-полимерные комплексы представляют собой многокомпонентные коллоидные объекты, находящиеся в водной среде, для которых важно не только определить наличие отдельных компонентов, но и сохранить их исходное гидратированное состояние в процессе анализа. При этом регистрация рамановских спектров биомакромолекул в растворе затруднена вследствие низкой интенсивности комбинационного рассеяния и

значительного вклада фонового сигнала. Использование полых микроструктурированных оптических волноводов позволяет увеличить эффективную длину взаимодействия света с исследуемым раствором и проводить регистрацию спектров непосредственно в жидкой среде, что делает данный подход перспективным для исследования белково-полимерных комплексов.

В использованной схеме полый микроструктурированный оптический волновод заполняли исследуемым раствором за счет капиллярных сил, после чего возбуждающее лазерное излучение фокусировали на область жидкости внутри волновода, а рассеянный сигнал регистрировали в геометрии обратного рассеяния. В отличие от измерений высушенных образцов или капель на твердой подложке спектры регистрировали для комплексов в водной среде, что особенно важно для интерпретации межмолекулярных взаимодействий в системе электростатических комплексов БСА@П(ВП-АК). Схема использованного подхода приведена на рисунке 3.8.

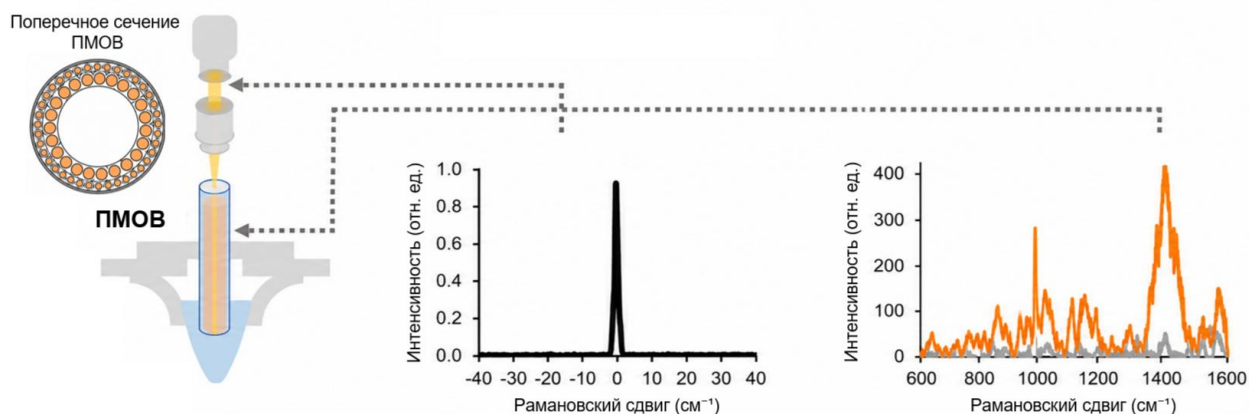


Рисунок 3.8. Схема регистрации рамановского сигнала белково-полимерных комплексов и микропузырьков БСА@П(ВП-АК) с использованием полого микроструктурированного оптического волновода.

На первом этапе были зарегистрированы рамановские спектры индивидуальных растворов БСА и П(ВП-АК), что позволило выделить диагностические полосы каждого компонента. Для БСА в качестве наиболее информативной была выбрана полоса при 1004 cm^{-1} , соответствующая

колебаниям фенилаланинового остатка. Для сополимера П(ВП-АК) были выделены полосы при 938, 1234 и 1428 см^{-1} . Полоса при 938 см^{-1} соответствует колебаниям пирролидинового цикла и связей С–С, полоса при 1234 см^{-1} связана с колебаниями С–С и деформационными колебаниями С–Н акрилатного фрагмента, а полоса при 1428 см^{-1} соответствует колебаниям пирролидинового кольца.

Сравнение спектров БСА, П(ВП-АК) и комплекса показало, что в спектре комплекса одновременно присутствуют полосы, характерные для обоих компонентов. При этом сохраняется интенсивная полоса БСА при 1004 см^{-1} , а также регистрируются полосы, соответствующие сополимеру П(ВП-АК). Полученные результаты подтверждают формирование белково-полимерного комплекса и послужили основой для последующего анализа изменений спектральных характеристик, обусловленных межмолекулярными взаимодействиями. Соответствующие спектры индивидуальных растворов БСА, П(ВП-АК) и комплекса БСА@П(ВП-АК) представлены на рисунке 3.9.

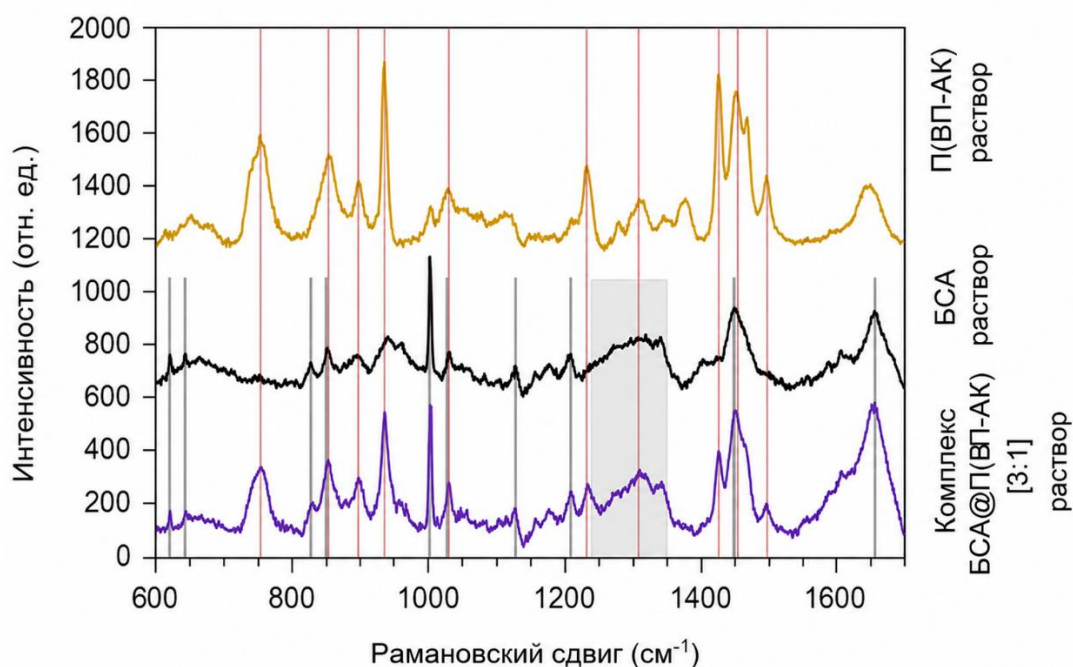


Рисунок 3.9. Рамановские спектры индивидуальных растворов БСА, П(ВП-АК) и комплекса БСА@П(ВП-АК), зарегистрированные с использованием ПМОВ.

Особый интерес представляет изменение интенсивности характеристических полос П(ВП-АК) в составе комплекса. В спектрах БСА@П(ВП-АК) интенсивность полос при 938, 1234 и 1428 см^{-1} снижалась по сравнению со спектром индивидуального раствора П(ВП-АК). Данный эффект не может быть объяснен только изменением относительного содержания компонентов, поскольку в исследуемой системе молекулы БСА и П(ВП-АК) находятся в общей водной фазе и образуют единый белково-полимерный комплекс. Следовательно, изменение интенсивности полос отражает изменение локального окружения функциональных групп сополимера при взаимодействии с молекулой альбумина.

Ослабление полос при 938 и 1428 см^{-1} , относящихся преимущественно к пирролидоновым фрагментам, указывает на участие этих групп во взаимодействии с БСА. Пирролидоновые звенья П(ВП-АК) способны взаимодействовать с гидрофобными участками белковой глобулы за счет ван-дер-ваальсовых и гидрофобных взаимодействий. В свою очередь, изменение интенсивности полосы при 1234 см^{-1} , связанной с акрилатным фрагментом сополимера, свидетельствует об участии карбоксильных групп П(ВП-АК) в электростатическом взаимодействии с заряженными аминокислотными остатками БСА.

Таким образом, результаты рамановской спектроскопии подтверждают нековалентную природу взаимодействия компонентов комплекса и свидетельствуют, что его образование сопровождается изменением локального окружения как пирролидоновых, так и акрилатных фрагментов сополимера.

Дополнительно были зарегистрированы рамановские спектры комплексов БСА@П(ВП-АК) при различных массовых соотношениях компонентов, а также соответствующих микропузырьков. (рис. 3.10) В спектрах микропузырьков сохранялись характеристические полосы как БСА, так и П(ВП-АК), что свидетельствует о сохранении белково-полимерной организации после ультразвуковой обработки. Следовательно,

сформированные в растворе белково-полимерные комплексы сохраняются в составе оболочки микропузырьков, что является дополнительным подтверждением ее гибридной природы.

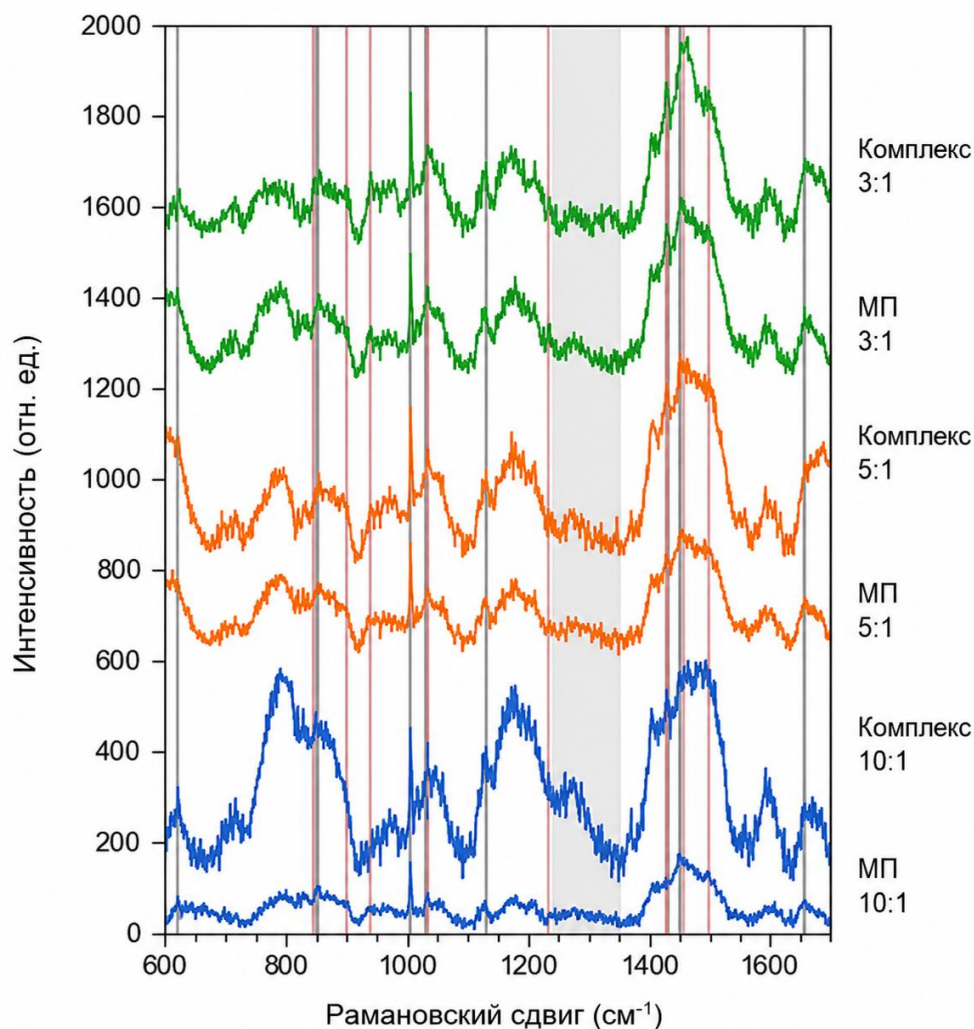


Рисунок 3.10. Рамановские спектры комплексов БСА@П(ВП-АК) и соответствующих микропузырьков при различных массовых соотношениях компонентов (3:1, 5:1 и 10:1).

В результате, применение рамановской спектроскопии с использованием полых микроструктурированных оптических волноводов позволило получить дополнительную информацию о составе и характере взаимодействия компонентов в системе БСА@П(ВП-АК). Метод выявил спектральные признаки комплексообразования между БСА и П(ВП-АК), а также показал сохранение белково-полимерной организации при переходе от комплекса в растворе к оболочке микропузырьков. Полученные данные

свидетельствуют о том, что предварительное формирование белково-полимерных комплексов в водной среде определяет молекулярную организацию оболочки микропузырьков БСА@П(ВП-АК).

3.3.4. Формирование и характеристика библиотеки комплексов БСА@П(ВП-АК)

После определения условий получения однородных растворов модельного комплекса БСА@П(ВП-АК) ОДМ с M_n 18 кДа и подтверждения нековалентной природы взаимодействия его компонентов (разделы 3.3.1–3.3.3) был выполнен переход к исследованию библиотеки белково-полимерных комплексов, сформированных с использованием сополимеров, различающихся числовой средней молекулярной массой, природой концевой гидрофобной группы и массовым соотношением с БСА. Целью данного этапа являлось установление взаимосвязи между составом белково-полимерной системы, структурной организацией комплексов и их физико-химическими характеристиками.

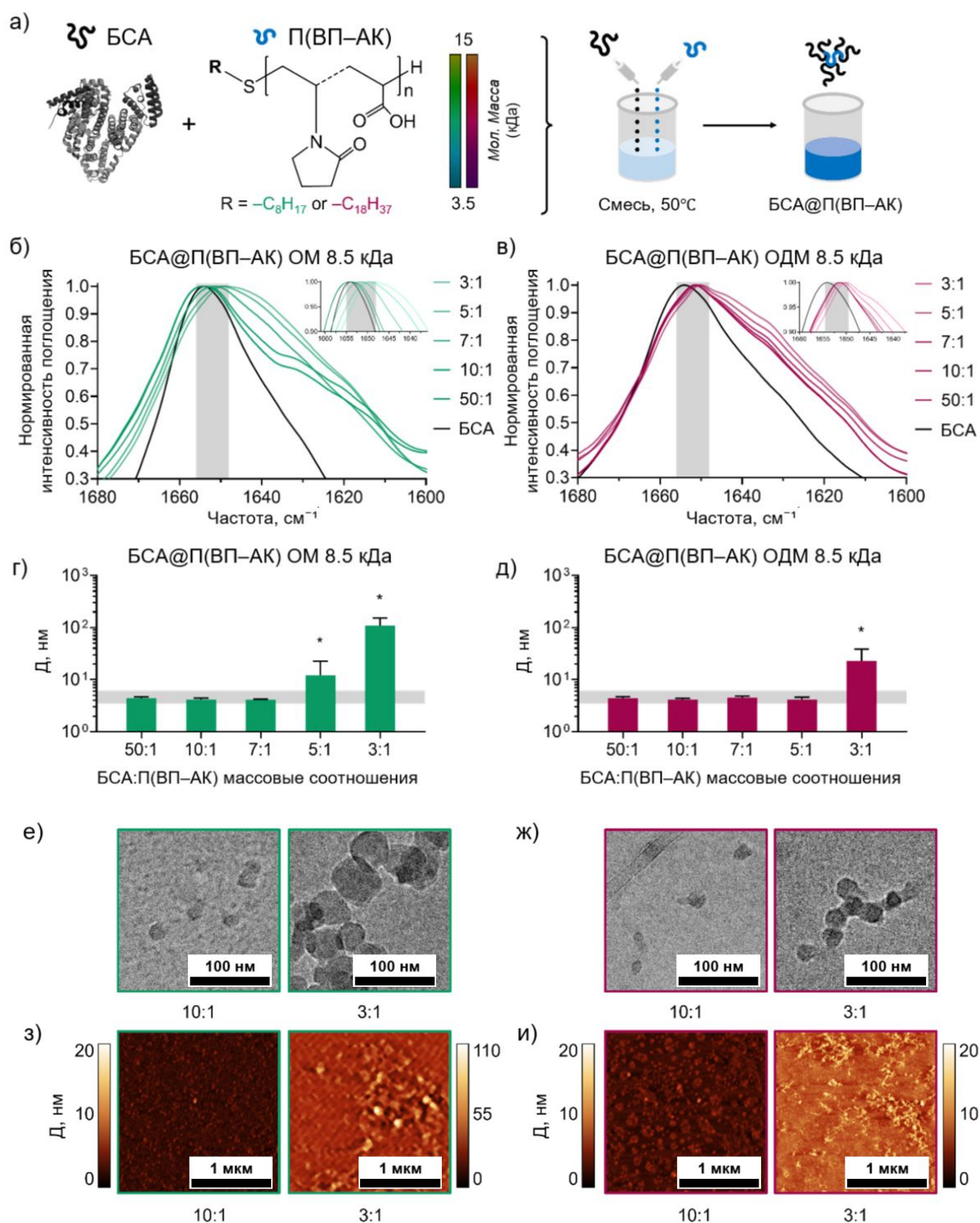


Рисунок 3.11. Формирование и характеристика библиотеки белково-полимерных комплексов БСА@П(ВП-АК): а) схема получения комплексов: растворы БСА и сополимера П(ВП-АК) смешивали при заданном массовом соотношении с последующей выдержкой при 50 °С в течение 1 ч; б, в) нормированные ИК-Фурье спектры в области полосы амид I БСА для комплексов с П(ВП-АК) ОМ Mn 8,5 кДа (б) и П(ВП-АК) ОДМ Mn 8,5 кДа (в)

при массовых соотношениях 50:1, 10:1, 7:1, 5:1 и 3:1; черная кривая – индивидуальный БСА; г, д) средний гидродинамический диаметр частиц, определенный методом ДСР, для комплексов с П(ВП-АК) ОМ Мп 8,5 кДа (г) и П(ВП-АК) ОДМ Мп 8,5 кДа (д). Серая область соответствует диаметру нативной глобулы БСА (5–7 нм). е, ж) репрезентативные крио-ПЭМ изображения комплексов с П(ВП-АК) ОМ Мп 8,5 кДа (е) и П(ВП-АК) ОДМ Мп 8,5 кДа (ж) при массовых соотношениях 10:1 и 3:1; масштаб – 100 нм; з, и) изображения поверхности тех же комплексов, полученные методом АСМ; масштаб – 1 мкм.

Комплексы БСА@П(ВП-АК) получали смешением водных растворов белка и соответствующего сополимера при заданных массовых соотношениях в диапазоне от 50:1 до 3:1 с последующей выдержкой при 50 °С в течение 1 ч (рис. 3.11а).

Для подтверждения взаимодействия компонентов во всей библиотеке комплексов был проведен анализ методом ИК-Фурье спектроскопии. На рисунке 3.11б, в представлены нормированные спектры в области полосы амид I БСА для комплексов с П(ВП-АК) ОМ Мп 8,5 кДа и П(ВП-АК) ОДМ Мп 8,5 кДа соответственно. Черная кривая соответствует индивидуальному БСА.

Во всех исследованных образцах полоса амид II сохраняла положение, характерное для нативного белка, тогда как полоса амид I последовательно смещалась и изменяла форму с увеличением доли сополимера. Поскольку область амид I ($1600\text{--}1700\text{ см}^{-1}$) наиболее чувствительна к изменениям вторичной структуры белка, наблюдаемые изменения свидетельствуют о перестройке локального окружения альбумина при образовании белково-полимерных комплексов.

Для концентрированных водных растворов БСА характерно смешанное вторичное строение, включающее α -спирали, β -структуры и неупорядоченные участки. Образование белково-полимерных комплексов сопровождается перераспределением этих структурных элементов, что проявляется в изменении формы полосы амид I.

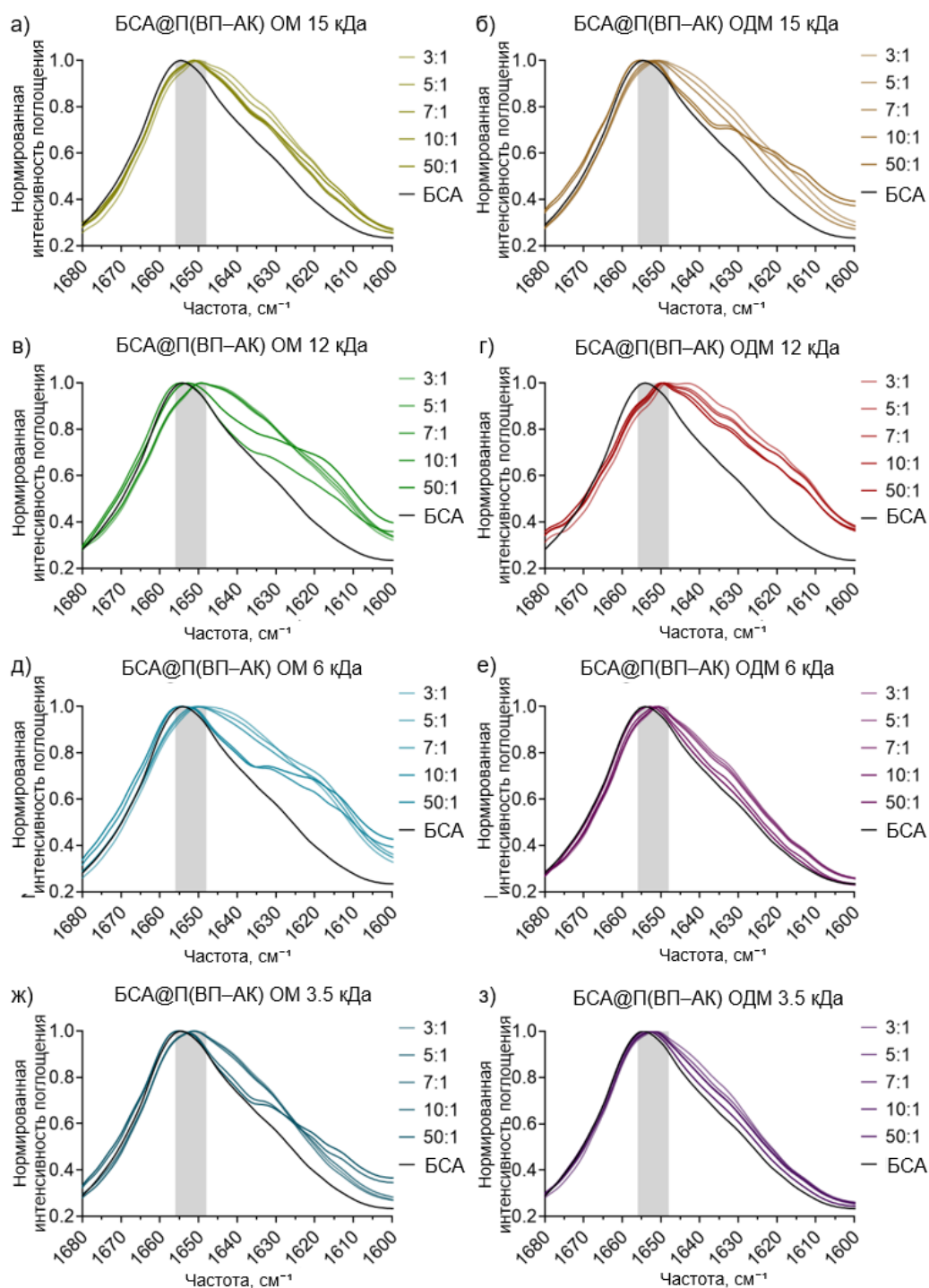


Рисунок 3.12. Нормированные ИК-Фурье спектры в области полосы амид I БСА (выделена серым) для комплексов БСА@П(ВП-АК), полученных с сополимерами различной молекулярной массы и строения: а–г) комплексы с П(ВП-АК) ОМ с M_n 15, 12, 6 и 3,5 кДа соответственно; д–з) комплексы с П(ВП-АК) ОДМ с M_n 15, 12, 6 и 3,5 кДа соответственно.

В исследуемой библиотеке комплексов по мере увеличения доли сополимера наблюдалось возрастание асимметрии полосы амид I (рис. 3.12а–

з), что свидетельствует о перераспределении вклада α -спиральных и β -структур при одновременном уменьшении доли неупорядоченных участков. Полученные результаты показывают, что варьирование массового соотношения БСА:П(ВП-АК), а также молекулярной массы и природы концевой группы сополимера оказывает непосредственное влияние на конформационное состояние альбумина в составе белково-полимерного комплекса.

Отсутствие выраженного уменьшения доли α -спиральных элементов и появления интенсивных полос агрегированных β -структур в области 1610–1625 см^{-1} свидетельствует об отсутствии глубокой денатурации БСА. Следовательно, взаимодействие альбумина с П(ВП-АК) сопровождалось преимущественно перераспределением элементов вторичной структуры и уменьшением доли неупорядоченных участков, не приводя к разрушению нативной конформации белковой глобулы.

Для сопоставления выявленных конформационных изменений с изменением размеров комплексов была проведена оценка гидродинамического диаметра частиц методом динамического светорассеяния (рис. 3.11г, д). Нативная глобула БСА характеризуется гидродинамическим диаметром 5–7 нм, что на диаграммах обозначено серой областью.

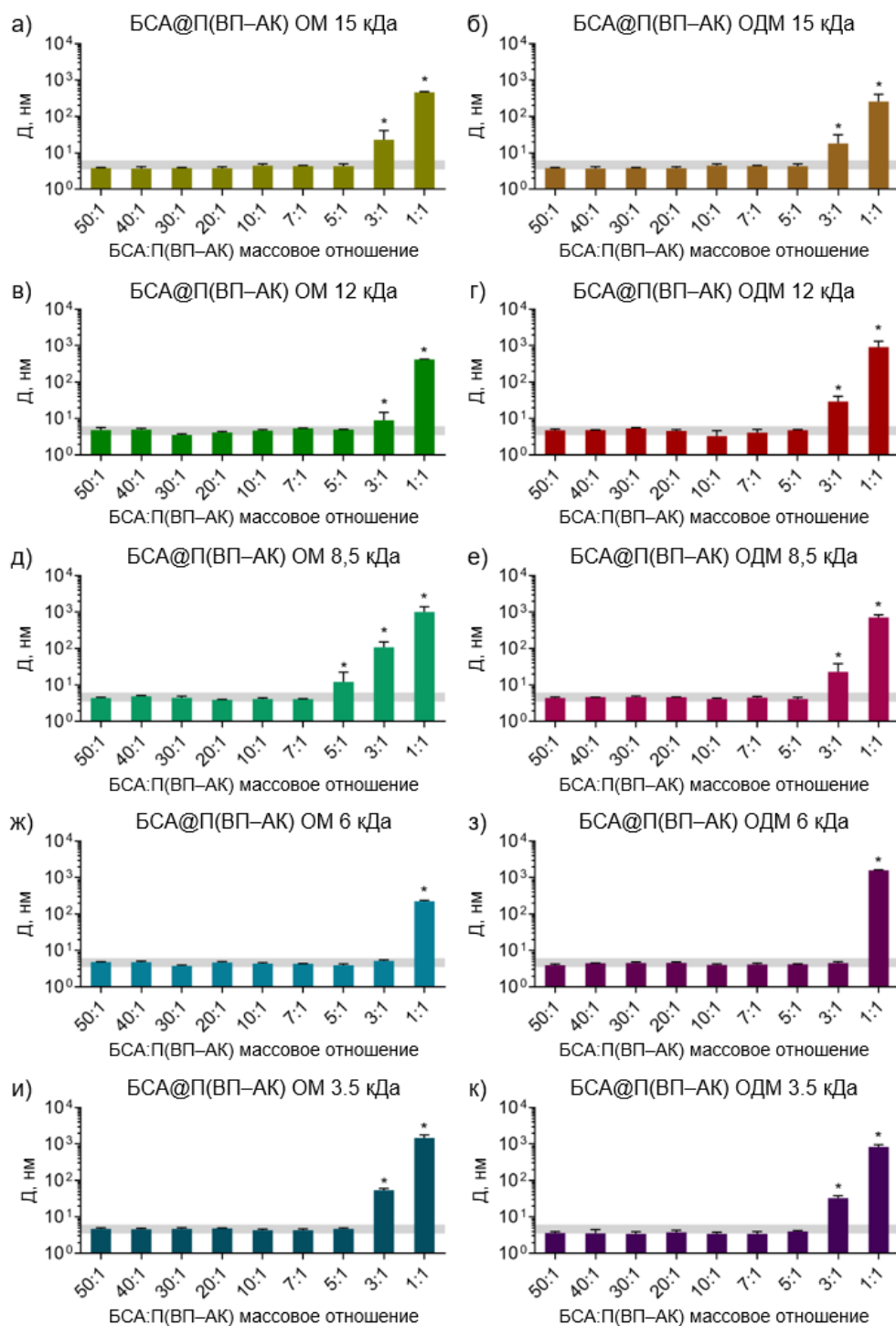


Рисунок 3.13. Зависимость среднего гидродинамического диаметра частиц (нм) в белково-полимерных комплексах БСА@П(ВП-АК) от массового соотношения компонентов для библиотеки сополимеров с различной молекулярной массой и различными концевыми группами: а, в, д, ж, и) комплексы с П(ВП-АК) ОМ (M_n 15, 12, 8,5, 6 и 3,5 кДа соответственно); б, г,

е, з, к) комплексы с П(ВП-АК) ОДМ (M_n 15, 12, 8,5, 6 и 3,5 кДа соответственно).

При низком содержании сополимера (массовые соотношения БСА:П(ВП-АК) от 50:1 до 10:1) средний гидродинамический диаметр частиц практически не отличался от диаметра нативной глобулы БСА (рисунок 2.13а–к). Это свидетельствует о сохранении дисперсного состояния белково-полимерных комплексов, необходимого для их эффективной адсорбции на межфазной границе. По мере увеличения доли сополимера наблюдалось увеличение гидродинамического диаметра комплексов. Статистически значимый рост размеров регистрировался при массовых соотношениях 3:1 и 1:1.

При массовом соотношении 1:1 для большинства сополимеров наблюдалось образование агрегатов размером в несколько сотен нанометров. Это указывает на усиление взаимодействия между белково-полимерными комплексами при увеличении содержания сополимера, приводящее к их ассоциации и формированию крупных агрегатов. Именно этот эффект ранее был установлен как ограничивающий получение микропузырьков при высоком содержании полимерного компонента.

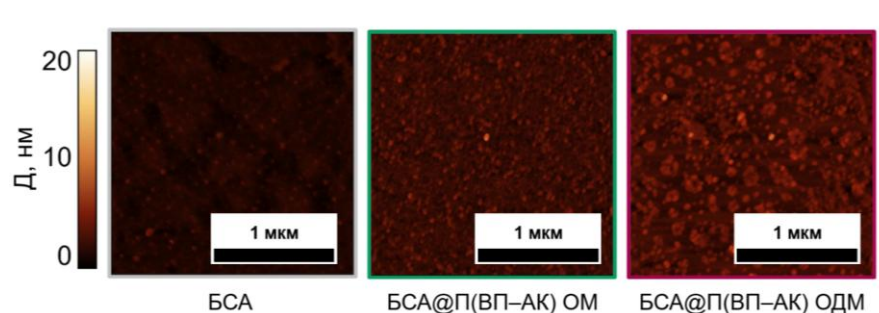


Рисунок 3.14. Репрезентативные топографические изображения поверхности, полученные методом атомно-силовой микроскопии (АСМ), для нативного БСА и белково-полимерных комплексов БСА@П(ВП-АК) с концевыми группами ОМ (M_n 8,5 кДа) и ОДМ (M_n 8,5 кДа) при массовом соотношении БСА:П(ВП-АК) = 10:1. Цветовая шкала соответствует высоте рельефа (нм).

Масштаб – 1 мкм.

Для подтверждения результатов, полученных методом динамического светорассеяния, были выбраны два характерных массовых соотношения БСА:П(ВП-АК) – 10:1 и 3:1 – и проведен морфологический анализ методом крио-ПЭМ и АСМ (рис. 3.11е–и).

При массовом соотношении 10:1 преимущественно наблюдались дискретные сферические частицы (рис. 3.14), размеры которых хорошо согласовывались с результатами динамического светорассеяния и лишь незначительно превышали гидродинамический диаметр нативной глобулы БСА. Данное массовое соотношение представляет особый интерес, поскольку является минимальным, при котором не наблюдается выраженного укрупнения белково-полимерных комплексов.

При массовом соотношении 3:1 наблюдалось увеличение размеров частиц и появление тенденции к их частичной ассоциации, что свидетельствует о начале формирования более крупных белково-полимерных структур.

Сравнение систем на основе сополимеров с различными концевыми группами выявило существенные различия в размерах комплексов при одинаковых массовых соотношениях компонентов. Так, при массовом соотношении 3:1 и M_n сополимера 8,5 кДа комплекс БСА@П(ВП-АК) ОМ характеризовался средним гидродинамическим диаметром 108 ± 35 нм (рис. 2.11г), тогда как для комплекса БСА@П(ВП-АК) ОДМ аналогичный показатель составил 23 ± 9 нм (рис. 3.11д).

Полученные различия согласуются с ранее установленными особенностями самоорганизации сополимеров (рис. 3.4а, б). Сополимер с концевой группой ОДМ характеризовался более выраженной склонностью к самоорганизации в растворе, тогда как сополимер с концевой группой ОМ устойчивых наноразмерных агрегатов не образовывал. Это различие определяло особенности формирования белково-полимерных комплексов и их размеры.

Таким образом, совокупность данных ИК-Фурье спектров, рамановской спектроскопии, динамического светорассеяния, крио-ПЭМ и АСМ показала, что варьирование массового соотношения компонентов, молекулярной массы и природы концевой группы сополимера оказывает непосредственное влияние на структурную организацию белково-полимерных комплексов. Оптимальный диапазон массовых соотношений 10:1–3:1 обеспечивал формирование комплексов контролируемого размера и стабильной морфологии.

Для выяснения молекулярных механизмов взаимодействия БСА с сополимером П(ВП-АК) и интерпретации выявленных экспериментальных закономерностей было выполнено моделирование методом молекулярной динамики.

3.3.5. Моделирование методом молекулярной динамики комплексов БСА@П(ВП-АК)

Для изучения взаимодействия БСА с синтезированными сополимерами П(ВП-АК) ОМ с M_n 8,5 кДа и П(ВП-АК) ОДМ с M_n 8,5 кДа в водной среде было выполнено моделирование методом молекулярной динамики на атомарном уровне. Целью моделирования являлось установление молекулярных механизмов взаимодействия компонентов комплекса и их связи с экспериментально наблюдаемыми структурными и коллоидными характеристиками системы. Модельная система включала одну молекулу БСА и соответствующее число цепей сополимера. В связи с ограничениями на размер расчетной ячейки были рассмотрены массовые соотношения БСА:П(ВП-АК) 7:1, 3:1 и 1:1 (рис. 3.15а).

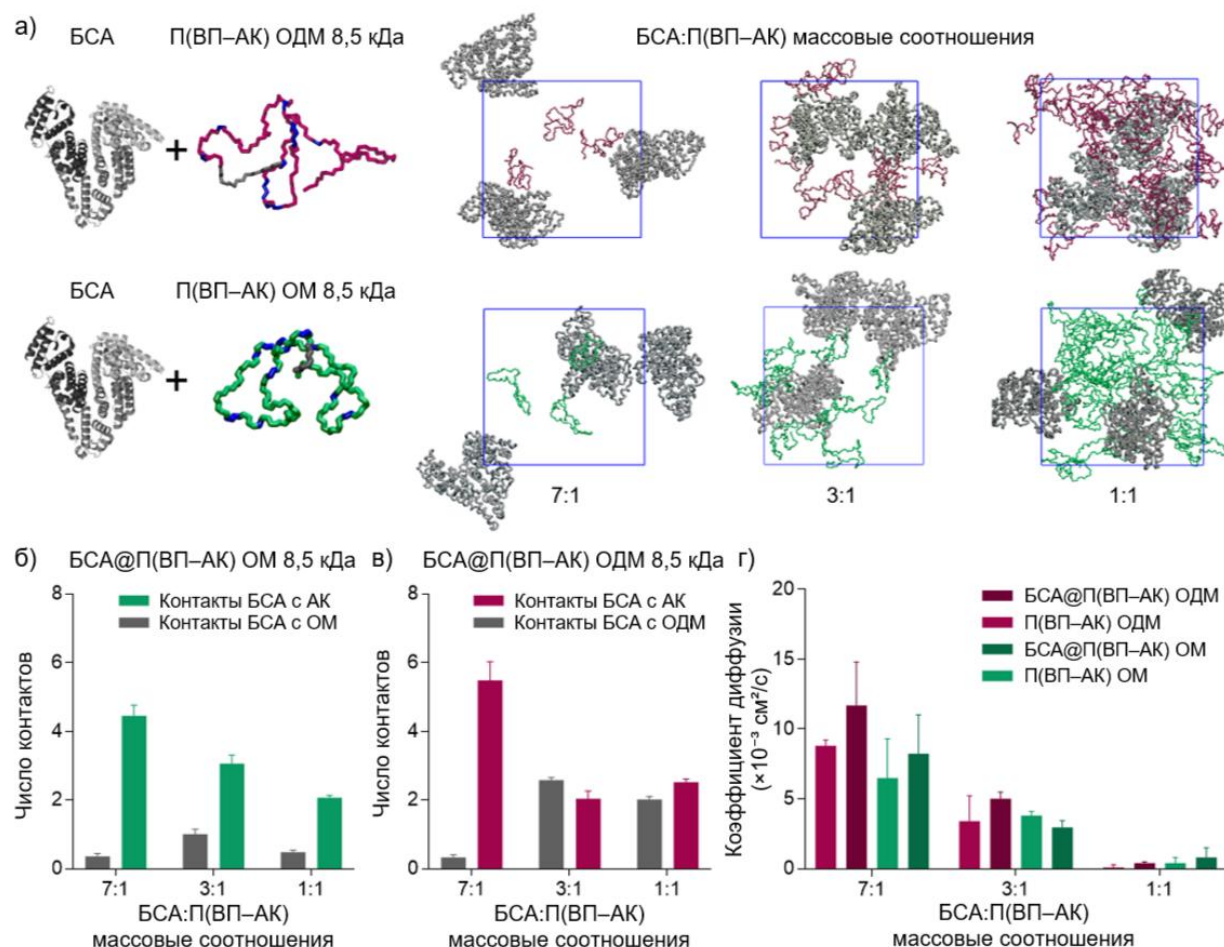


Рисунок 3.15. Результаты моделирования методом молекулярной динамики взаимодействия БСА с сополимерами П(ВП-АК) с M_n 8,5 кДа: а) схема молекул и расчетной ячейки моделирования; остатки акриловой кислоты (АК) показаны синим цветом, концевые группы ОМ и ОДМ – серым; для наглядности основная цепь сополимера с ОМ-концевой группой окрашена в зеленый цвет, с ОДМ-концевой группой – в красный; рассмотрены массовые соотношения БСА:П(ВП-АК) 7:1, 3:1 и 1:1; б, в) относительное число контактов (в пересчете на одну цепь сополимера) между аминокислотными остатками БСА и функциональными группами сополимера (остатками АК и концевыми гидрофобными группами) для сополимеров с ОМ- и ОДМ-концевыми группами соответственно; г) коэффициенты диффузии БСА и сополимеров в составе комплексов БСА@П(ВП-АК).

Моделирование показало наличие выраженных взаимодействий между молекулой БСА и обоими типами сополимеров, что хорошо согласуется с

экспериментально наблюдаемыми изменениями конформационного состояния альбумина и подтверждает участие сополимера в формировании белково-полимерного комплекса.

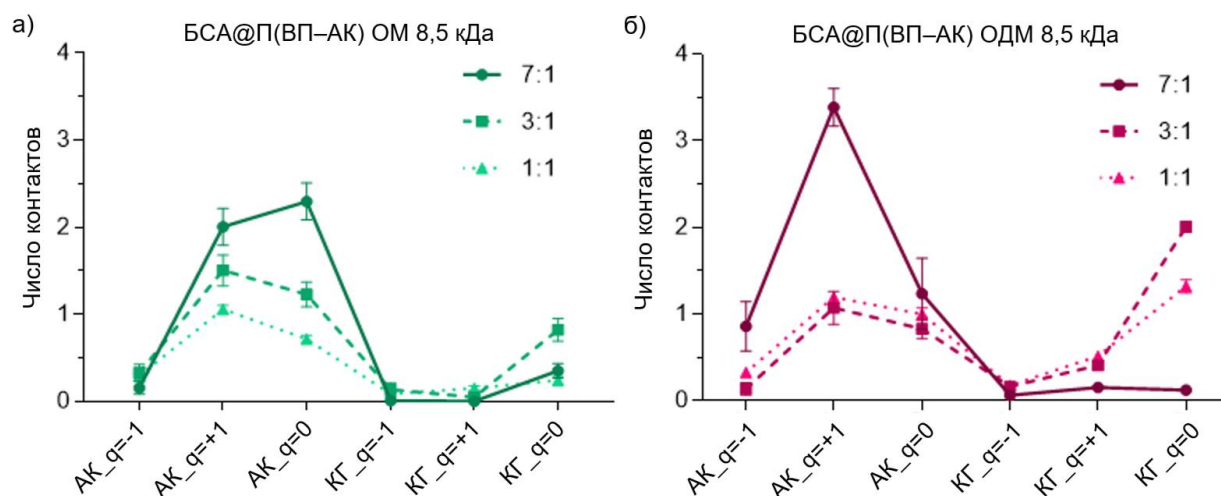


Рисунок 3.16. Относительное число контактов (в пересчете на одну цепь сополимера) между аминокислотными остатками БСА и сополимерами П(ВП-АК) с M_n 8,5 кДа с а) ОМ- и б) ОДМ-концевыми группами в зависимости от заряда аминокислотных остатков БСА. Аминокислотные остатки условно разделены на три группы по заряду: положительные ($q = +$), отрицательные ($q = -$) и нейтральные ($q = 0$). АК – остатки акриловой кислоты; ОМ и ОДМ – концевые гидрофобные группы сополимера.

Для количественной оценки взаимодействия компонентов было рассчитано относительное число контактов (в пересчете на одну цепь сополимера) между аминокислотными остатками БСА и функциональными группами сополимера – остатками акриловой кислоты, а также концевыми гидрофобными группами (ОМ или ОДМ). Аминокислотные остатки БСА условно разделяли на положительно заряженные, отрицательно заряженные и нейтральные; соответствующие зависимости представлены на рисунке 3.16.

В связи с ограничениями на размер расчетной ячейки и высокими вычислительными затратами моделирование выполняли для трех массовых соотношений БСА:П(ВП-АК) – 7:1, 3:1 и 1:1 (рис. 3.15а). Выбор этих соотношений позволил охватить три характерных режима

комплексообразования: область умеренного содержания сополимера, соответствующую экспериментально значимым составам; область начала укрупнения комплексов по данным динамического светорассеяния; и область избытка сополимера, сопровождающуюся образованием агрегатов и затрудняющую получение микропузырьков. Массовое соотношение 7:1 использовали вместо 5:1 для увеличения шага по содержанию сополимера при ограниченном числе рассчитываемых систем.

На рисунке 3.15б, в представлены результаты расчета числа контактов между аминокислотными остатками БСА и функциональными группами сополимера для систем с ОМ- и ОДМ-концевыми группами соответственно. Взаимодействие сополимеров с положительно заряженными и нейтральными аминокислотными остатками потенциально может сопровождаться локальными конформационными перестройками белка, включая перераспределение элементов вторичной структуры [225, 226, 238].

Независимо от природы концевой гидрофобной группы относительное число контактов между остатками акриловой кислоты и молекулой БСА уменьшалось с увеличением доли сополимера в системе. Для сополимера с ОМ-концевой группой снижение происходило постепенно, тогда как для сополимера с ОДМ-концевой группой наблюдалось резкое уменьшение числа контактов при переходе от массового соотношения 7:1 к 3:1; дальнейшее увеличение содержания сополимера до 1:1 практически не влияло на этот показатель. Вероятно, это связано с усилением взаимодействия между сополимерными цепями при повышении их концентрации, что ограничивает доступ карбоксильных групп к поверхности белка. Наибольшее число контактов реализовывалось между остатками акриловой кислоты и положительно заряженными либо нейтральными аминокислотными остатками БСА.

Концевые гидрофобные группы ОМ и ОДМ практически не взаимодействовали с заряженными участками поверхности белка; единичные контакты наблюдались преимущественно с нейтральными аминокислотными

остатками. При увеличении содержания сополимера число таких контактов также уменьшалось. Это свидетельствует о том, что основной вклад в стабилизацию белково-полимерного комплекса вносят взаимодействия карбоксильных групп сополимера с поверхностью БСА, тогда как вклад концевых гидрофобных групп носит вспомогательный характер.

Таким образом, результаты моделирования методом молекулярной динамики хорошо согласуются с данными ИК-Фурье спектроскопии, динамического светорассеяния и микроскопических исследований и подтверждают, что изменение массового соотношения компонентов определяет баланс белок-полимерных и межполимерных взаимодействий, лежащий в основе перехода от компактных белково-полимерных комплексов к агрегированным структурам.

3.3.6. Комплексы с низкомолекулярным стабилизатором спермином

В качестве низкомолекулярной стабилизирующей добавки был использован спермин – природный полиамин, способный образовывать с альбумином нековалентные комплексы за счет преимущественно электростатических взаимодействий. В отличие от амфифильного сополимера П(ВП-АК), спермин не содержит протяженной макромолекулярной цепи и не способен к выраженной самоорганизации в растворе. Вследствие этого увеличение его содержания не сопровождается образованием объемных полимерных ассоциатов и переходом системы в гелеобразное состояние, как это наблюдалось для комплексов БСА@П(ВП-АК) при превышении суммарной концентрации 5 % (мас./об.) (раздел 3.3.1).

По этой причине при получении комплексов БСА@ПАм концентрацию альбумина поддерживали постоянной на уровне 5 % (мас./об.), а содержание спермина изменяли в широком диапазоне молярных и соответствующих им массовых соотношений компонентов. Комплексы получали смешением растворов БСА и спермина с последующей выдержкой при 50 °С в течение 1 ч.

Для выбора оптимального состава исследовали влияние содержания спермина на гидродинамический размер комплексов и поверхностное натяжение растворов. По данным динамического светорассеяния образование комплексов сопровождалось увеличением гидродинамического диаметра частиц в течение первого часа после смешения компонентов, после чего размеры практически не изменялись. При увеличении содержания спермина наблюдалось постепенное снижение поверхностного натяжения растворов – примерно с 52 до 49,5 мН/м, что свидетельствует об увеличении межфазной активности системы.

На основании совокупности данных по гидродинамическому диаметру комплексов, поверхностному натяжению растворов и эффективности последующего получения микропузырьков в качестве оптимального было выбрано массовое соотношение БСА:ПАм 10:1. Данный состав использовали во всех последующих исследованиях белково-композитных микропузырьков на основе комплексов БСА@ПАм.

3.3.7. Сравнительный анализ взаимодействия БСА с низкомолекулярными и макромолекулярными стабилизирующими добавками

На основании проведённых исследований для дальнейшего сравнительного анализа были выбраны оптимальные составы обеих систем: для комплексов массовое отношение БСА@П(ВП-АК) 5:1, а для комплексов БСА@ПАм 10:1. Использование фиксированных составов позволило исключить влияние массового соотношения компонентов и сосредоточить внимание на сравнении влияния природы стабилизирующей добавки на свойства белково-композитных систем.

Для выявления роли природы стабилизирующей добавки в процессах комплексообразования было выполнено сравнительное моделирование методом молекулярной динамики для систем БСА@П(ВП-АК) и БСА@ПАм. (рис. 3.17)

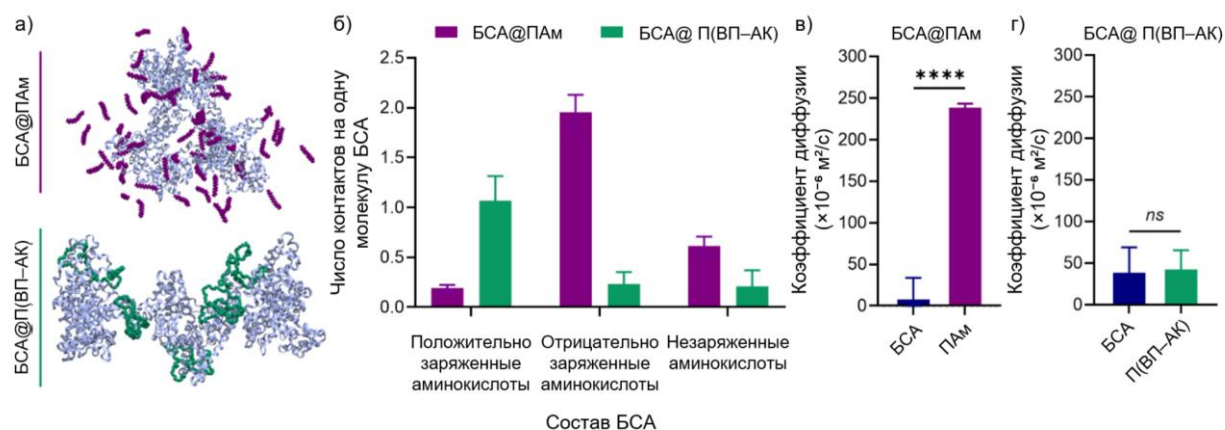


Рисунок 3.17. Результаты моделирования методом молекулярной динамики взаимодействия БСА с добавками ПАм и П(ВП-АК): а) схематическое изображение компонентов системы и расчетной ячейки моделирования (молекулы воды не показаны); глобулы БСА выделены синим цветом, молекулы ПАм – фиолетовым, макромолекулы П(ВП-АК) – зеленым; б) относительное число контактов (в пересчете на одну молекулу БСА) между аминокислотными остатками белка и функциональными группами добавок; в, г) коэффициенты диффузии БСА и соответствующих добавок в составе комплексов: в) система БСА@ПАм, г) система БСА@П(ВП-АК).

В модельные системы входили молекула БСА и соответствующее количество молекул стабилизирующей добавки в водной среде. На рисунке 3.17а представлены характерные конфигурации комплексов БСА@ПАм и БСА@П(ВП-АК), иллюстрирующие взаимное расположение компонентов после достижения равновесного состояния.

Для количественной характеристики взаимодействия было рассчитано относительное число контактов между аминокислотными остатками БСА и функциональными группами стабилизирующих добавок (рис. 3.17б). Аминокислотные остатки классифицировали по заряду на положительно заряженные, отрицательно заряженные и нейтральные. В качестве взаимодействующих групп рассматривали аминогруппы ПАм и карбоксильные группы звеньев акриловой кислоты сополимера П(ВП-АК).

Установлено, что ПАм преимущественно взаимодействует с отрицательно заряженными аминокислотными остатками БСА, тогда как сополимер П(ВП-АК) характеризуется преимущественным связыванием с положительно заряженными участками поверхности белка.

Анализ коэффициентов диффузии компонентов в составе комплексов показал, что в системе БСА@ПАм коэффициент диффузии белка значительно ниже коэффициента диффузии ПАм, тогда как в системе БСА@П(ВП-АК) коэффициенты диффузии белка и сополимера сопоставимы (рис. 3.17в, г). Это свидетельствует о различии динамической организации исследуемых комплексов и указывает на более согласованное движение компонентов в системе БСА@П(ВП-АК).

Комплексообразование БСА с сополимером П(ВП-АК) сопровождалось постепенным снижением интенсивности флуоресценции триптофановых остатков белка (рис. 3.18б), тогда как для системы с ПАм подобные изменения отсутствовали (рис. 3.18а). Наблюдаемое тушение флуоресценции указывает на изменение микроокружения триптофановых остатков и, следовательно, на более выраженное вовлечение белка в процессы комплексообразования в присутствии макромолекулярной стабилизирующей добавки.

Одновременно в системе БСА@П(ВП-АК) наблюдалось появление слабой мутности раствора, что свидетельствует о формировании агрегированных структур. Таким образом, снижение интенсивности флуоресценции сопровождалось макроскопическими признаками агрегации, указывающими на взаимосвязь процессов комплексообразования и укрупнения частиц.

Данное предположение подтверждается результатами динамического светорассеяния: гидродинамический диаметр комплексов БСА@П(ВП-АК) составил (27 ± 5) нм, что существенно превышает размеры нативного БСА и комплексов БСА@ПАм $((7 \pm 2)$ нм). Тем самым переход от индивидуальных молекул белка к агрегированным белково-полимерным комплексам получил количественное подтверждение.

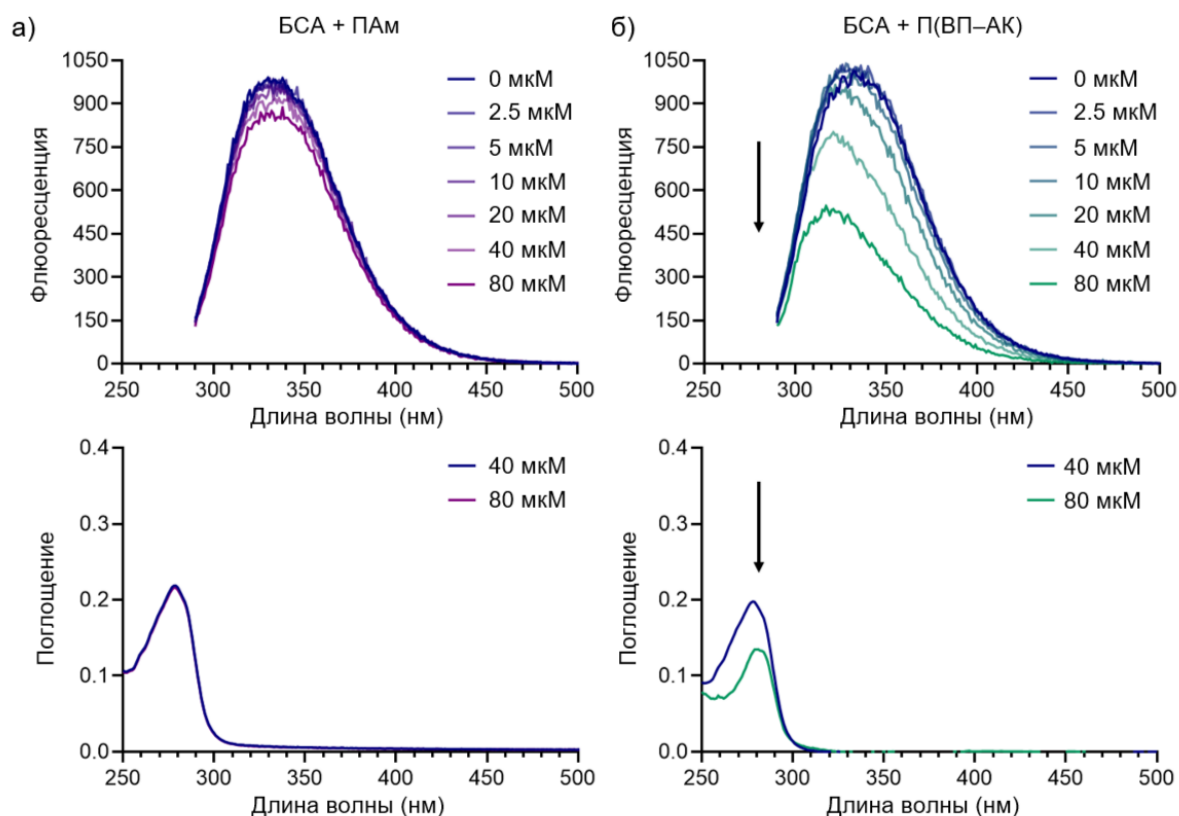


Рисунок 3.18. Тушение флуоресценции триптофановых остатков БСА при комплексообразовании со стабилизаторами: а, б) спектры флуоресценции БСА при увеличении концентрации а) ПАм и б) П(ВП-АК); соответствующие спектры поглощения приведены для исходного раствора БСА (синий цвет) и конечных продуктов комплексообразования – БСА@ПАм (фиолетовый) и БСА@П(ВП-АК) (зелёный) после коррекции базовой линии.

Несмотря на увеличение оптической плотности системы БСА@П(ВП-АК), обусловленное рассеянием света коллоидными частицами, после коррекции базовой линии наблюдалось уменьшение интенсивности характерной полосы поглощения БСА (рис. 3.18), что свидетельствует о снижении доли свободного белка. Это указывает на более полное вовлечение альбумина в состав белково-полимерных комплексов в присутствии П(ВП-АК).

Совокупность данных, полученных методами флуоресцентной спектроскопии, динамического светорассеяния и спектрофотометрии, свидетельствует о различии механизмов взаимодействия стабилизирующих

добавок с БСА. ПАм формирует преимущественно индивидуальные комплексы без выраженной агрегации, тогда как П(ВП-АК) способствует образованию агрегированных белково-полимерных структур. При этом отсутствие значимых спектральных сдвигов и сохранение формы полосы флуоресценции указывают на отсутствие прямого взаимодействия добавок с триптофановыми остатками, локализованными в гидрофобных карманах белковой глобулы. Это свидетельствует о сохранении доступности данных участков и подтверждает перспективность рассматриваемых систем для разработки лекарственно-нагруженных форм [239, 240].

Таким образом, совокупность экспериментальных и расчётных данных показала, что природа стабилизирующей добавки определяет механизм взаимодействия с БСА, степень вовлечения белка в комплексообразование и структурную организацию белково-композитной системы. Макромолекулярный сополимер П(ВП-АК) формирует протяжённые белково-полимерные комплексы с выраженной ассоциацией, тогда как низкомолекулярный ПАм обеспечивает образование более компактных, преимущественно индивидуальных комплексов.

Установлено, что варьирование природы стабилизирующей добавки и её содержания позволяет регулировать баланс между белок-полимерными и межполимерными взаимодействиями, определяя переход от дисперсных к агрегированным состояниям системы. Это, в свою очередь, влияет на способность комплексов к адсорбции на межфазной границе, их структурную устойчивость и динамические характеристики.

Тем самым показано, что природа стабилизирующей добавки и структурная организация белково-композитных комплексов являются важным факторами, определяющими формирование межфазной оболочки микропузырьков и их последующие физико-химические и акустические свойства.

3.4. Структура и свойства белково-композитных микропузырьков

3.4.1. Получение и морфологическая характеристика БСА@П(ВП-АК) микропузырьков

После установления закономерностей формирования белково-полимерных комплексов была разработана и оптимизирована методика получения белково-композитных микропузырьков методом ультразвуковой обработки. На этапе оптимизации были исследованы влияние температуры предварительной подготовки белково-полимерных комплексов, температуры водяной бани во время ультразвукового воздействия, положения сонотрода относительно поверхности раствора, продолжительности ультразвуковой обработки, а также условий последующей стабилизации микропузырьков. В результате было установлено, что воспроизводимое получение микропузырьков обеспечивается при предварительном нагревании комплекса до 50 °С, проведении ультразвуковой обработки в водяной бане при температуре 50 °С с использованием сонотрода, зафиксированного строго на границе раздела фаз, воздействии ультразвуком с частотой 20 кГц мощностью 100 Вт в течение 3 мин и последующей стабилизации полученной суспензии при 4 °С в течение не менее 30 минут. Подбор указанных параметров позволил обеспечить воспроизводимое формирование микропузырьков с высокой концентрацией, контролируемыми размерами и стабильными морфологическими характеристиками.

На первом этапе исследование проводили на модельной системе БСА@П(ВП-АК) с числовой средней молекулярной массой сополимера 18 кДа и ОДМ-концевой группой. Данная система была выбрана в качестве модельной для отработки методики получения микропузырьков и анализа влияния состава белково-полимерного комплекса на морфологические характеристики формирующейся оболочки до перехода к исследованию расширенной серии сополимеров.

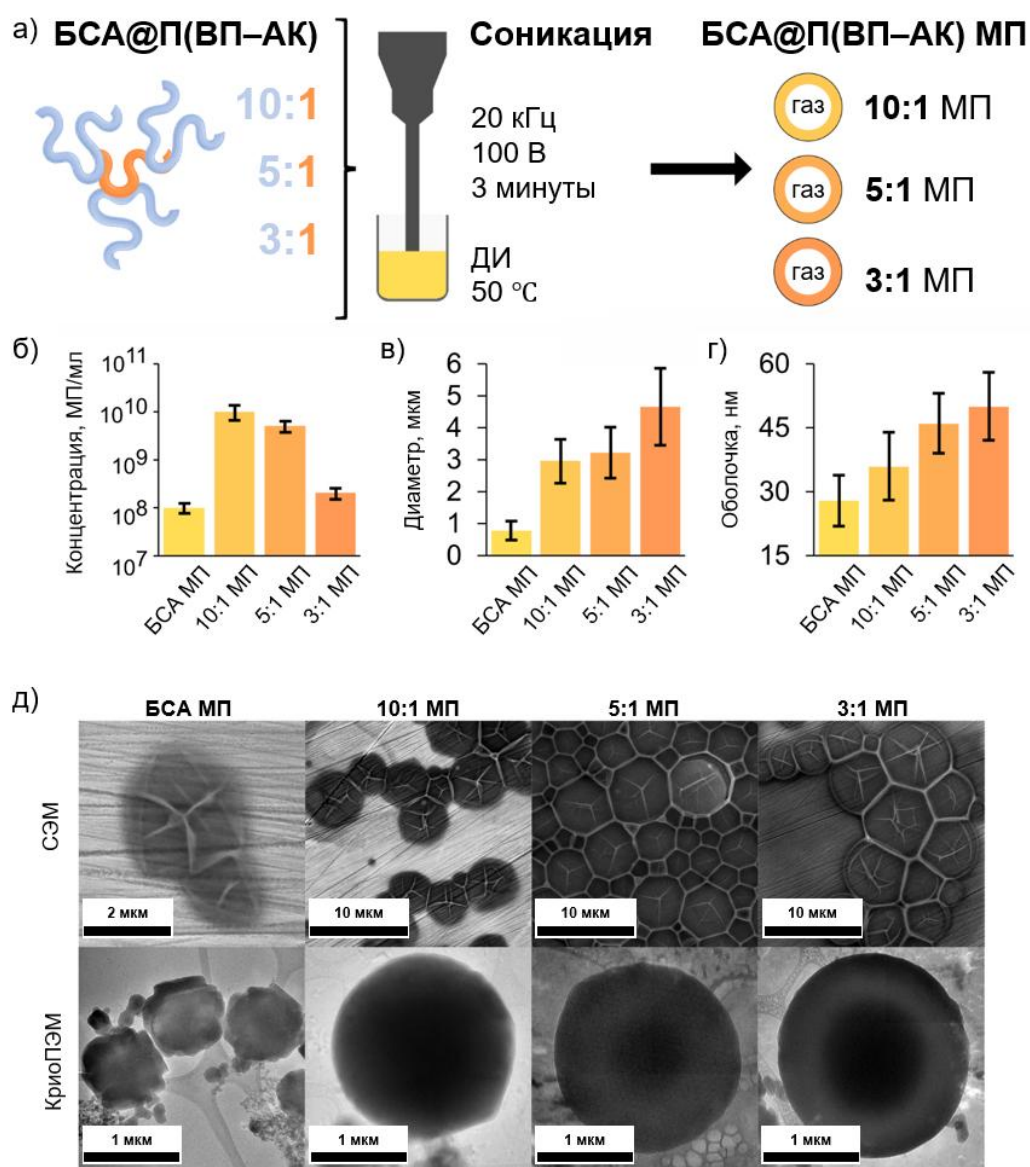


Рисунок 3.19. Получение и морфологическая характеристика микропузырьков БСА@П(ВП-АК) (модельная система, M_n сополимера 18 кДа): а) схема получения микропузырьков БСА@П(ВП-АК) при массовых соотношениях БСА:П(ВП-АК) 10:1, 5:1 и 3:1 методом ультразвуковой обработки (20 кГц, суммарная концентрация комплекса 5 % (мас./об.)); БСА МП контрольный образец; б) концентрация микропузырьков; в) средний диаметр микропузырьков по данным оптической микроскопии; г) толщина оболочки по данным сканирующей электронной микроскопии; д) репрезентативные изображения микропузырьков, полученные методами сканирующей электронной микроскопии и криоэлектронной просвечивающей микроскопии.

С Синтез микропузырьков осуществляли на основе комплексов БСА@П(ВП-АК) с массовыми соотношениями БСА:П(ВП-АК) 10:1, 5:1 и 3:1 методом ультразвуковой обработки при частоте 20 кГц и суммарной концентрации комплекса 5 % (мас./об.). Получение микропузырьков проводили с использованием оптимизированных условий ультразвуковой обработки, разработанных на предварительном этапе исследования. В качестве контрольного образца использовали БСА МП (рис. 3.19а).

Количественный анализ методом оптической микроскопии показал, что введение сополимера оказывает существенное влияние как на концентрацию, так и на размеры получаемых микропузырьков (рис. 3.19б, в). Наибольшая концентрация микропузырьков была достигнута при массовом соотношении БСА:П(ВП-АК) = 10:1, тогда как при увеличении содержания сополимера до 5:1 и особенно до 3:1 наблюдалось последовательное снижение концентрации микропузырьков. Полученные результаты свидетельствуют о том, что для модельной системы БСА@П(ВП-АК) ОДМ с M_n 18 кДа увеличение содержания сополимера выше оптимального значения приводит к снижению эффективности формирования микропузырьков.

Средний диаметр БСА МП составил $0,8 \pm 0,3$ мкм, тогда как для белково-композитных микропузырьков он увеличивался до $3,0 \pm 0,6$ мкм (10:1), $3,2 \pm 0,8$ мкм (5:1) и около 5 мкм (3:1). Несмотря на увеличение размеров, диаметр всех образцов не превышал 7 мкм, что соответствует требованиям, предъявляемым к внутрисосудистым ультразвуковым контрастным агентам.

Анализ методом сканирующей электронной микроскопии показал, что увеличение содержания сополимера сопровождалось возрастанием толщины оболочки микропузырьков (рис. 3.19г). Для БСА МП толщина оболочки составила 28 ± 8 нм, тогда как для образца с массовым соотношением 3:1 она достигала 50 ± 8 нм. Полученные результаты свидетельствуют о формировании более развитого межфазного слоя при увеличении содержания сополимера.

Данные криоэлектронной просвечивающей микроскопии подтвердили сохранение сферической формы микропузырьков после быстрого замораживания (рис. 3.19д), что свидетельствует о структурной устойчивости сформированной оболочки.

Таким образом, разработанная методика позволила воспроизводимо получать белково-композитные микропузырьки с контролируемыми морфологическими характеристиками. Полученные результаты показали, что изменение состава белково-полимерного комплекса оказывает непосредственное влияние на концентрацию микропузырьков, их размеры и толщину оболочки. Вместе с тем морфологические исследования сами по себе не позволяют однозначно подтвердить композитную природу оболочки, что потребовало проведения дальнейших исследований с использованием флуоресцентной конфокальной лазерной сканирующей микроскопии и спектроскопических методов.

3.4.2. Подтверждение гибридной природы оболочки белково-композитных микропузырьков

Полученные ранее результаты рамановской спектроскопии показали, что БСА и П(ВП-АК) образуют устойчивые белково-полимерные комплексы еще в растворе до стадии ультразвуковой обработки. Вместе с тем сам факт существования комплекса не позволяет однозначно утверждать, что сополимер сохраняется в составе оболочки сформированных микропузырьков, поскольку в процессе их генерации часть полимерных молекул может оставаться в объеме раствора. Поэтому следующим этапом работы стало прямое подтверждение участия обоих компонентов в формировании оболочки микропузырьков.

Для визуализации распределения компонентов использовали конфокальную лазерную сканирующую микроскопию. (рис. 3.20) Исследование проводили на модельной системе БСА@П(ВП-АК) с M_n сополимера 18 кДа при массовом соотношении БСА:П(ВП-АК) = 10:1. БСА

предварительно метили флуоресцеином, а сополимер П(ВП-АК) – родамином 6G.

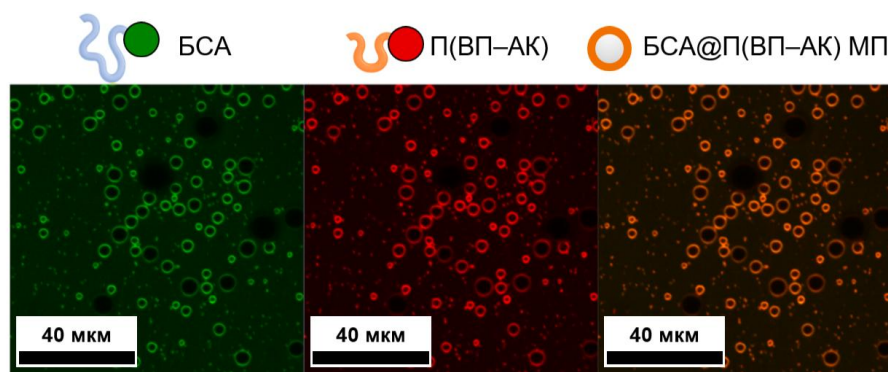


Рисунок 3.20. Конфокальные изображения микропузырьков БСА@П(ВП-АК) с разделным флуоресцентным мечением компонентов: канал флуоресцеина (БСА), канал родамина 6G (П(ВП-АК)) и совмещенное изображение.

Как видно из конфокальных изображений, сигналы обоих красителей локализуются по периферии микропузырьков, формируя характерную кольцевую структуру. При совмещении каналов наблюдается их пространственное перекрывание без разделения на отдельные области, что свидетельствует о совместной локализации белка и сополимера в составе оболочки.

В результате, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия позволила непосредственно визуализировать одновременное присутствие БСА и П(ВП-АК) в оболочке микропузырьков. Полученные данные подтверждают, что сополимер не остается в объеме раствора после ультразвуковой обработки, а входит в состав межфазной оболочки совместно с белком.

Полученные результаты хорошо согласуются с ранее установленным механизмом формирования белково-полимерных комплексов и подтверждают, что в процессе ультразвуковой обработки на границе газ-жидкость адсорбируются не отдельные молекулы белка и сополимера, а предварительно сформированные белково-полимерные комплексы.

Следует отметить, что конфокальная микроскопия обеспечивает прямую визуализацию пространственного распределения компонентов в оболочке микропузырьков. Вместе с тем для подтверждения сохранения белково-полимерной организации оболочки и оценки состояния белка после ультразвуковой обработки необходимы дополнительные спектроскопические исследования, результаты которых представлены в последующих разделах.

3.4.3. Влияние состава и структуры БСА@П(ВП-АК) комплексов на концентрацию и свойства микропузырьков

После подтверждения гибридной природы оболочки на модельной системе БСА@П(ВП-АК) с числовой средней молекулярной массой сополимера 18 кДа было проведено расширенное исследование с использованием библиотеки сополимеров П(ВП-АК), различающихся молекулярной массой, природой концевой гидрофобной группы и составом белково-полимерных комплексов. Целью данного этапа являлось установление влияния указанных параметров на процесс формирования, концентрацию и морфологические характеристики белково-композитных микропузырьков.

Микропузырьки получали на основе предварительно сформированных комплексов БСА@П(ВП-АК) методом ультразвуковой обработки (рисунок 3.21а) по уже разработанной методике на основе модельного сополимера.

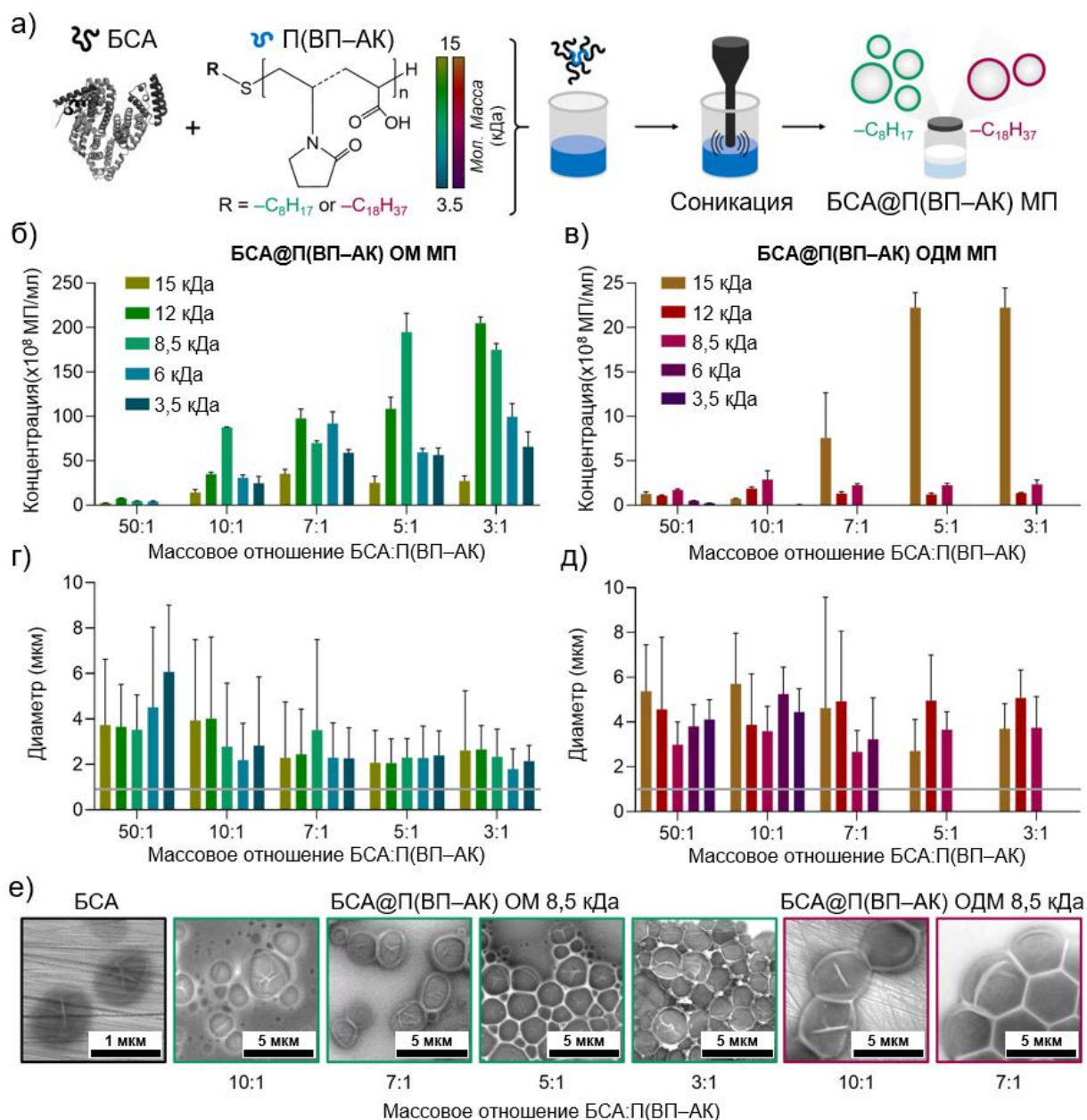


Рисунок 3.21. Концентрация, размер и морфология микропузырьков БСА@П(ВП-АК): а) схема получения микропузырьков на основе предварительно сформированных комплексов БСА@П(ВП-АК) методом ультразвуковой обработки; б, в) концентрация микропузырьков для систем с сополимерами П(ВП-АК) ОМ и П(ВП-АК) ОДМ при различных значениях M_n ; г, д) средний диаметр микропузырьков для соответствующих систем; серой линией показано значение среднего диаметра БСА МП (1 мкм); е) репрезентативные электронные микрофотографии БСА МП и БСА@П(ВП-АК) МП, полученные методом сканирующей электронной микроскопии

(П(ВП-АК) ОМ, M_n 8,5 кДа – массовые соотношения БСА:П(ВП-АК) 10:1, 7:1, 5:1 и 3:1; П(ВП-АК) ОДМ, M_n 8,5 кДа – массовые соотношения 10:1 и 7:1)

Анализ концентрации микропузырьков показал, что введение сополимера в состав оболочки приводит к её существенному увеличению по сравнению с БСА МП (10^8 МП/мл) (рис. 3.21б, в). При этом характер изменения концентрации определяется как молекулярной массой сополимера, так и природой его концевой гидрофобной группы. Для сополимеров П(ВП-АК) ОМ наблюдалось значительное увеличение концентрации микропузырьков, тогда как для систем на основе П(ВП-АК) ОДМ данный эффект был выражен менее существенно.

В отличие от концентрации, средний диаметр микропузырьков изменялся в значительно меньшей степени (рис. 3.21г, д). Для систем на основе П(ВП-АК) ОМ он находился преимущественно в диапазоне 2–3 мкм, тогда как для сополимеров П(ВП-АК) ОДМ составлял около 3–4 мкм. Несмотря на увеличение по сравнению с БСА МП ($1 \pm 0,3$ мкм), размеры всех образцов оставались в диапазоне, допустимом для внутрисосудистых ультразвуковых контрастных агентов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что варьирование структуры сополимера оказывает значительно большее влияние на эффективность формирования микропузырьков, чем на их размеры.

Морфологический анализ методом сканирующей электронной микроскопии показал, что введение сополимера сопровождается формированием более развитой оболочки по сравнению с БСА МП (рис. 3.21е). Полученные результаты хорошо согласуются с данными, представленными для модельной системы, и подтверждают, что включение сополимера в состав белково-композитной оболочки приводит к увеличению толщины межфазного слоя независимо от молекулярной массы и природы концевой гидрофобной группы.

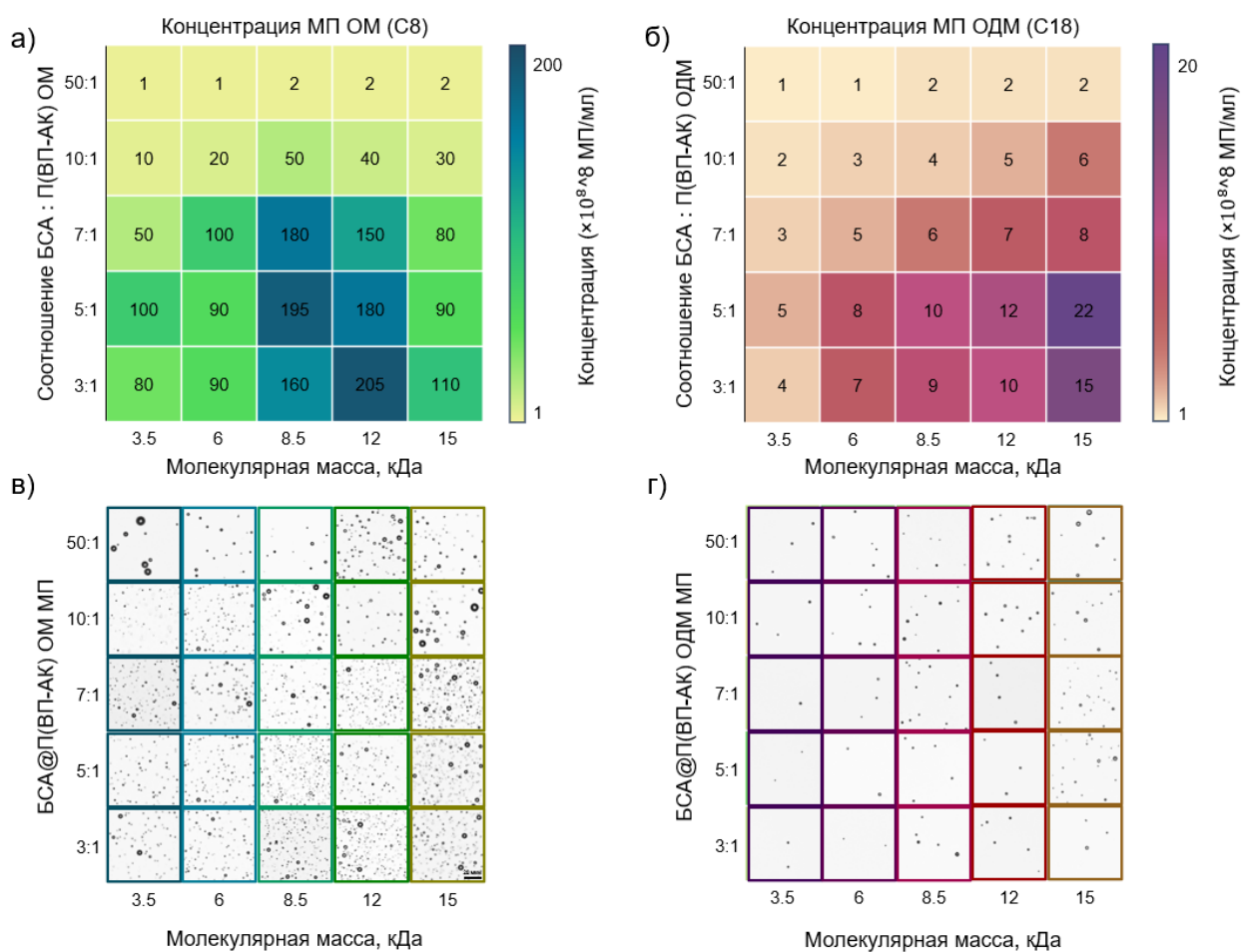


Рисунок 3.22. а, б) Тепловые карты концентрации микропузырьков ($\times 10^8$ МП/мл) для серий П(ВП-АК) ОМ и П(ВП-АК) ОДМ в зависимости от числовой средней молекулярной массы сополимера (M_n , 3,5–15 кДа) и массового соотношения БСА:П(ВП-АК) (50:1, 10:1, 7:1, 5:1 и 3:1). в, г) Репрезентативные изображения микропузырьков, полученные методом оптической микроскопии, для систем на основе комплексов БСА@П(ВП-АК) ОМ и БСА@П(ВП-АК) ОДМ при различных массовых соотношениях компонентов и молекулярной массе сополимера. Масштаб – 20 мкм.

Для более детального анализа закономерностей формирования микропузырьков экспериментальные данные были представлены в виде тепловых карт (рис. 3.22а, б). Такой способ представления результатов позволяет одновременно оценить влияние молекулярной массы сополимера и

массового соотношения компонентов на эффективность формирования микропузырьков.

Анализ тепловых карт показал, что зависимость концентрации микропузырьков от состава белково-полимерного комплекса носит немонотонный характер. При низком содержании сополимера (массовое соотношение 50:1) его влияние выражено слабо, тогда как увеличение доли сополимера сопровождалось существенным повышением концентрации микропузырьков. Наиболее высокие значения были получены для сополимеров П(ВП-АК) ОМ с $M_n = 8,5\text{--}12$ кДа при массовых соотношениях 5:1–3:1, где концентрация микропузырьков достигала $2,05 \times 10^{10}$ МП/мл, что примерно в 200 раз превышало значение для БСА МП.

Для сополимеров П(ВП-АК) ОДМ аналогичная зависимость сохранялась, однако максимальные концентрации микропузырьков были существенно ниже и не превышали $2,22 \times 10^9$ МП/мл, что соответствует приблизительно 22-кратному увеличению относительно БСА МП. Полученные результаты свидетельствуют о том, что природа концевой гидрофобной группы оказывает определяющее влияние на эффективность формирования микропузырьков.

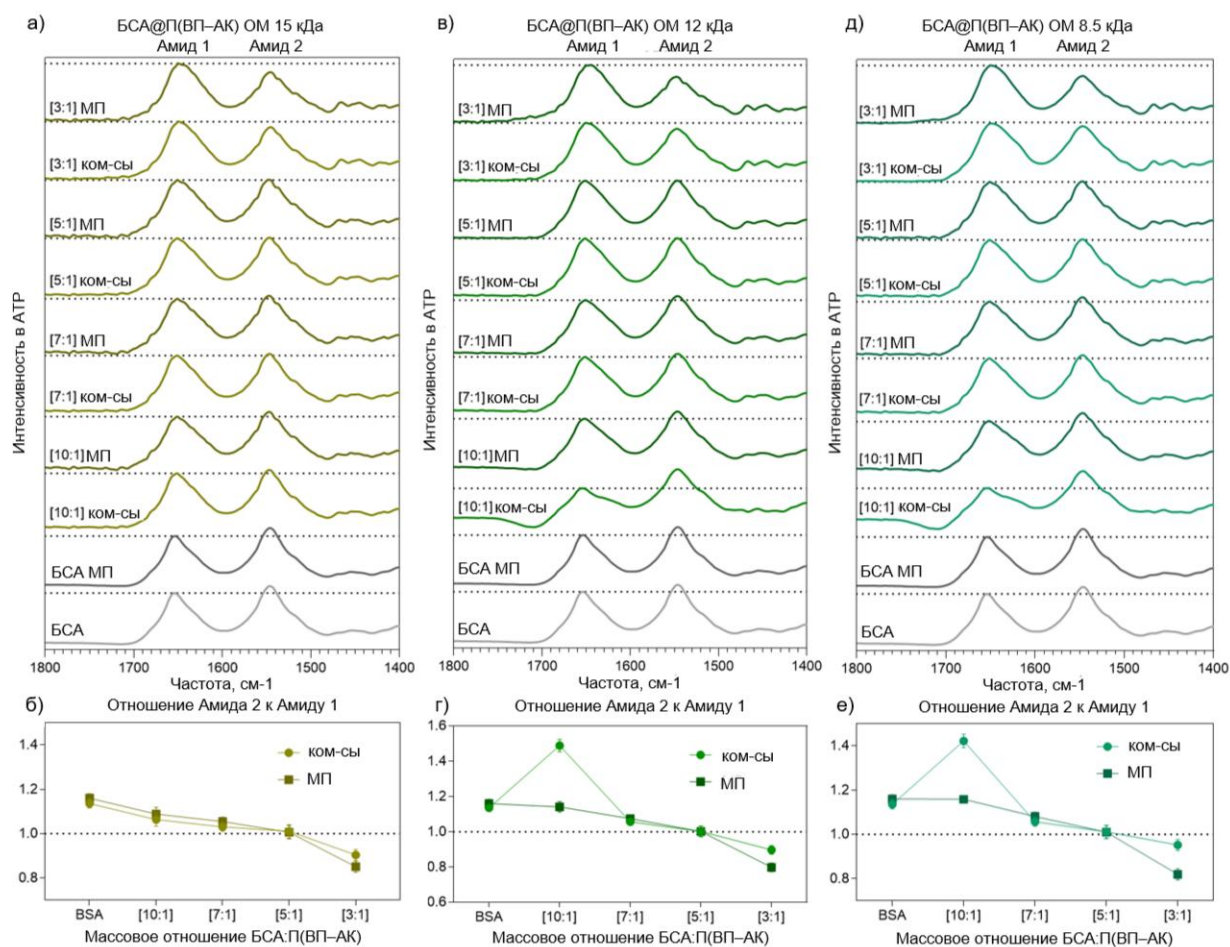
Сопоставление тепловых карт с данными оптической микроскопии (рис. 3.22в, г) показало, что увеличение концентрации обусловлено преимущественно возрастанием числа образующихся микропузырьков, тогда как их размеры изменяются значительно слабее. Следовательно, основным параметром, определяемым структурой белково-полимерного комплекса, является эффективность генерации микропузырьков.

Таким образом, изменение молекулярной массы сополимера, природы концевой гидрофобной группы и массового соотношения компонентов определяет эффективность формирования белково-композитных микропузырьков и их морфологические характеристики. Вместе с тем

полученные результаты не позволяют оценить, сохраняется ли структурная организация белка после формирования оболочки микропузырьков, что потребовало проведения дальнейших спектроскопических исследований.

3.4.4. Спектроскопическая характеристика белково-композитных микропузырьков БСА@П(ВП-АК)

Морфологические исследования показали, что изменение состава белково-полимерных комплексов оказывает существенное влияние на процесс формирования микропузырьков. Однако сами по себе эти результаты не позволяют установить, сопровождается ли образование межфазной оболочки изменением конформационного состояния белка. Для оценки структурной организации белкового компонента в составе комплексов и соответствующих микропузырьков был проведён анализ методом ИК-Фурье спектроскопии. (рис. 3.23)



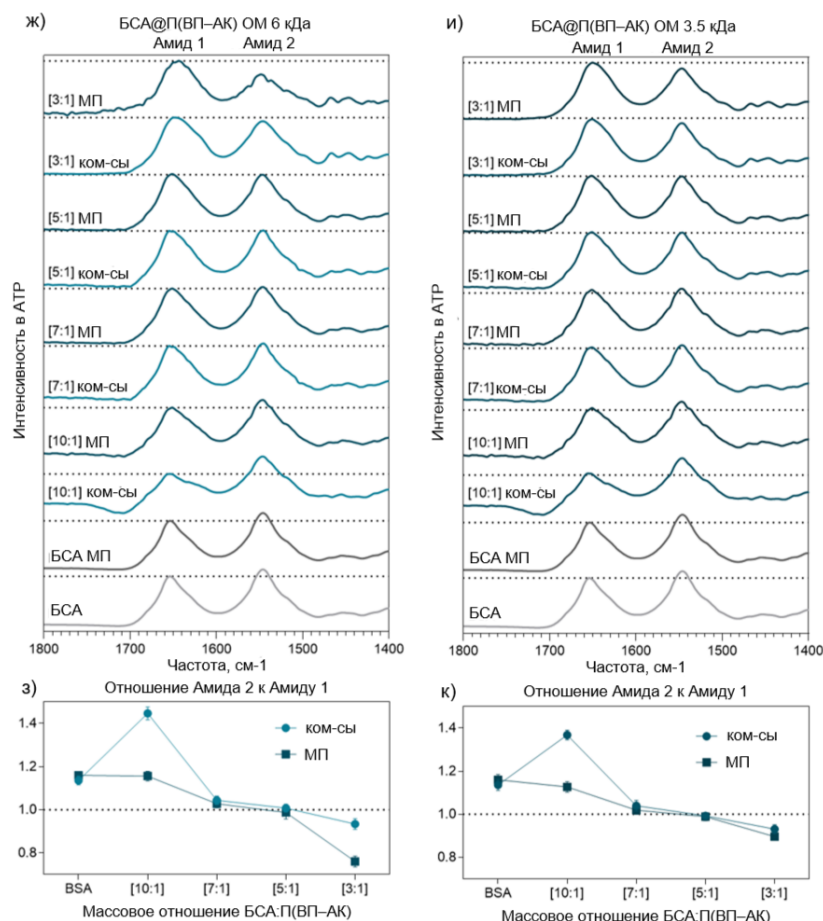


Рисунок 3.23. Анализ ИК-Фурье спектров комплексов БСА@П(ВП-АК) и микропузырьков. а, в, д, ж, и) ИК-Фурье спектры растворов нативного БСА, БСА МП, комплексов БСА@П(ВП-АК) и микропузырьков при массовых соотношениях БСА:П(ВП-АК) 10:1, 7:1, 5:1 и 3:1 для сополимеров П(ВП-АК) ОМ с M_n 15, 12, 8,5, 6 и 3,5 кДа. Показаны полосы Амид I и Амид II; пунктирной линией отмечен максимум полосы Амид I. б, г, е, з, к) Отношение интенсивностей полос Амид II/Амид I для комплексов и микропузырьков при различных массовых соотношениях компонентов.

Для оценки структурного состояния белка в составе белково-полимерных комплексов и соответствующих микропузырьков был проведён анализ методом ИК-Фурье спектроскопии (рис. 3.23). Сравнение спектров показало, что формирование микропузырьков не сопровождается существенными изменениями положения и формы полосы Амид I по сравнению с исходными комплексами, что свидетельствует о сохранении

общей структурной организации белково-полимерного комплекса при его переходе в состав межфазной оболочки.

Более чувствительным параметром оказалось отношение интенсивностей полос Амид II/Амид I (рис. 3.23б, г, е, з, к). При увеличении содержания сополимера до массового соотношения 5:1 наблюдалось постепенное выравнивание интенсивностей полос, тогда как при дальнейшем увеличении его доли (3:1) интенсивность полосы Амид II уменьшалась относительно Амид I. Полученные изменения указывают на перераспределение характера взаимодействия между белком и сополимером и могут быть связаны с уменьшением доступности поверхности белковой глобулы вследствие усиления межполимерных взаимодействий при повышенном содержании сополимера.

Следует отметить, что аналогичные изменения наблюдались как для белково-полимерных комплексов, так и для соответствующих микропузырьков. Это подтверждает, что после ультразвуковой обработки белково-полимерная организация системы сохраняется и оболочка микропузырьков формируется из предварительно образовавшихся комплексов, а не в результате независимой адсорбции отдельных компонентов.

Для более детальной оценки изменений вторичной структуры белка была выполнена деконволюция полосы Амид I для всех исследованных комплексов и соответствующих микропузырьков с использованием программного обеспечения OPUS (Bruker). Модель разложения была построена на основании данных рентгеноструктурного анализа БСА и литературных значений положений полос, соответствующих различным элементам вторичной структуры белка. В модель были включены гауссовы компоненты с максимумами при 1624, 1630, 1638 и 1691 см^{-1} , соответствующие β -структурам, компонент при 1655 см^{-1} , соответствующий α -спиралям, компонент при 1647 см^{-1} , относящийся к неупорядоченным участкам, и компонент при 1675 см^{-1} , соответствующий β -поворотам.

Следует отметить, что для исходного раствора БСА с концентрацией 50 мг/мл распределение элементов вторичной структуры отличалось от данных рентгеноструктурного анализа, что согласуется с литературными сведениями о частичной структурной реорганизации альбумина в концентрированных растворах. Согласно результатам деконволюции (рис. 3.24), содержание α -спиральных элементов в исходном БСА составляло около 50 %, β -структур – около 40 %, а неупорядоченных участков – около 10 %.

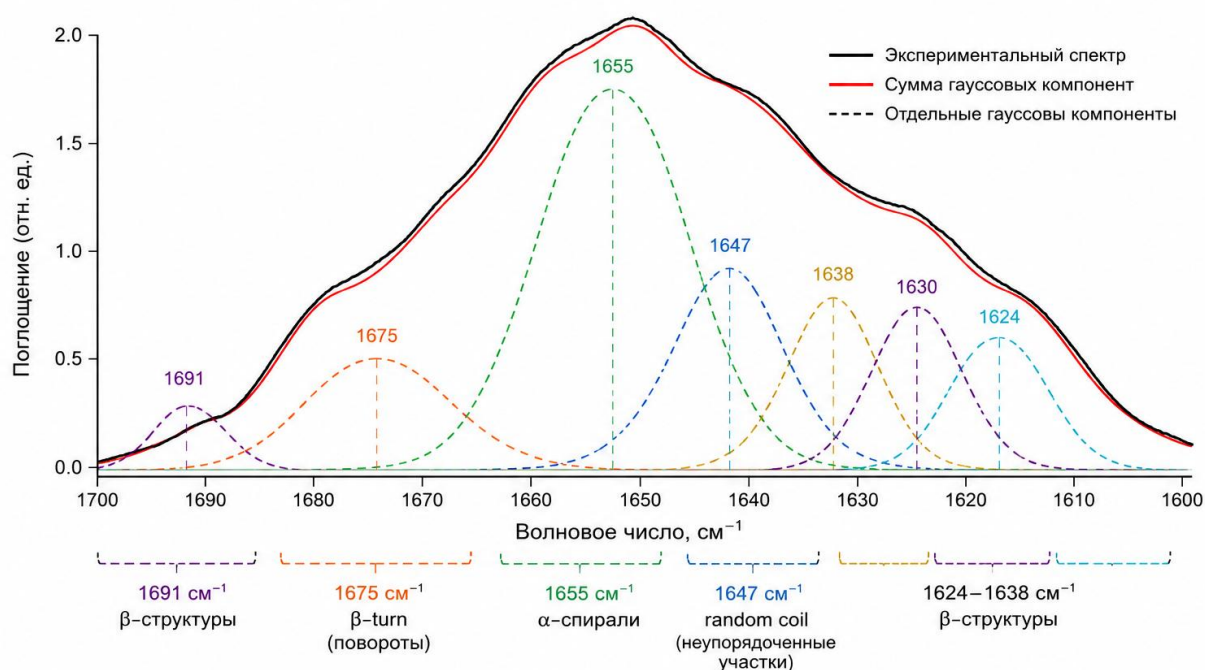


Рисунок 3.24. Схематическое представление деконволюции полосы Амид I ИК-Фурье спектра БСА на гауссовы компоненты, соответствующие различным элементам вторичной структуры белка.

В качестве примера в таблице 3.2 представлены результаты деконволюции полосы Амид I для системы БСА@П(ВП-АК) ОМ с $M_n = 8,5$ кДа, тогда как аналогичный анализ был выполнен для всех исследованных белково-полимерных комплексов и соответствующих микропузырьков.

Анализ показал, что образование белково-полимерных комплексов сопровождалось увеличением вклада β -структур до 45–51 % при одновременном уменьшении доли неупорядоченных участков до 2–6 %. При этом содержание α -спиральных элементов изменялось незначительно и находилось в диапазоне 45–50 %. После формирования микропузырьков

указанное распределение элементов вторичной структуры практически сохранялось, что свидетельствует об отсутствии существенной структурной перестройки белка при переходе комплекса в состав межфазной оболочки.

Для количественной оценки степени частичной денатурации белка был использован параметр относительной потери α -спиральной структуры. Такой подход основан на том, что денатурация сывороточного альбумина сопровождается уменьшением содержания α -спиральных элементов и увеличением вклада β -структур и неупорядоченных участков [247]. Параметр рассчитывали по выражению:

$$D = \frac{\alpha_0 - \alpha_i}{\alpha_0} \times 100\%, \quad (3.4)$$

где α_0 – содержание α -спиральных элементов в исходном растворе БСА (50 %); α_i – содержание α -спиралей в исследуемом образце.

Таблица 3.2. Результаты деконволюции полосы Амид I ИК-Фурье спектров системы БСА@П(ВП-АК) ОМ ($M_n = 8,5$ кДа) и соответствующих микропузырьков.

Образец 8,5 ОМ	α , %	β , %	Неупоряд., %	D, %
БСА	50	40	10	0
Комплекс 3:1	47	47	6	6
МП 3:1	49	47	4	2
Комплекс 5:1	47	46	6	6
МП 5:1	51	45	4	0
Комплекс 7:1	50	48	2	0
МП 7:1	47	52	1	6
Комплекс 10:1	46	51	2	8

МП 10:1	49	46	5	2
---------	----	----	---	---

Согласно выполненным расчётам, относительная потеря α -спиральной структуры для комплексов БСА@П(ВП-АК) ОМ с $M_n = 8,5$ кДа составляла 0–8 %, тогда как для соответствующих микропузырьков не превышала 6 %. Максимальное значение (8 %) наблюдалось для комплекса с массовым соотношением БСА:П(ВП-АК) = 10:1. Для большинства исследованных микропузырьков с другими сополимерами величина D находилась в диапазоне 0–10 %, что также свидетельствует о сохранении преимущественно нативной структуры белка.

Следовательно, результаты ИК-Фурье спектроскопии и последующей деконволюции полосы Амид I показывают, что образование белково-полимерных комплексов сопровождается лишь незначительным перераспределением элементов вторичной структуры БСА без выраженной денатурации белковой глобулы. После формирования микропузырьков указанные закономерности сохраняются, что подтверждает сохранение структурной организации белка в составе белково-композитной оболочки и согласуется с ранее полученными данными конфокальной микроскопии и рамановской спектроскопии о сохранении белково-полимерной организации системы.

3.4.5. Получение белково-композитных микропузырьков на основе различных типов комплексов

После разработки методики получения микропузырьков на основе белково-полимерных комплексов БСА@П(ВП-АК) её применимость была проверена для ранее полученных оптимальных комплексов БСА@ПАм. Использование ранее оптимизированных условий синтеза позволило получить стабильные микропузырьки и подтвердило универсальность разработанного подхода для белково-композитных систем, содержащих как макромолекулярные, так и низкомолекулярные добавки. (рис. 3.25)

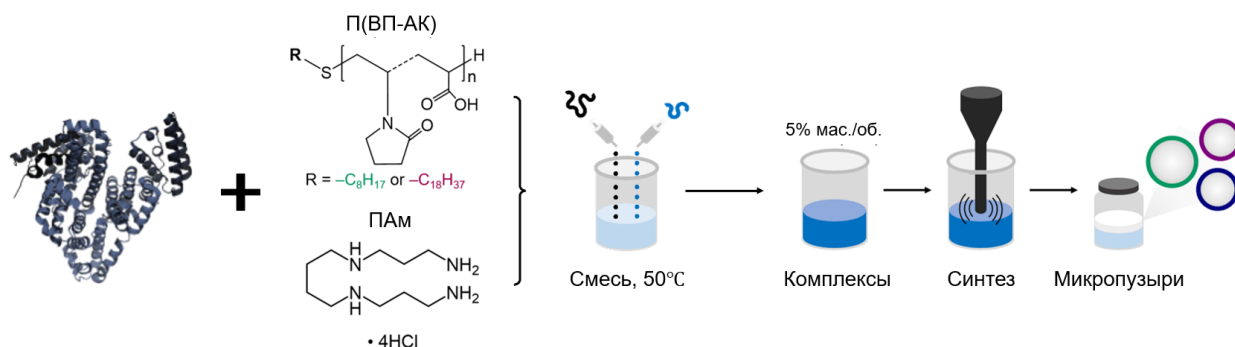


Рисунок 3.25. Схема синтеза микропузырьков. БСА (66 кДа) смешивали с амфифильными сополимерами П(ВП-АК) (3,5–15 кДа; C₈/ОМ или C₁₈/ОДМ) либо с полиамином (спермин, 0,35 кДа). При 50 °С формировались белково-композитные комплексы, которые после соникации (20 кГц, 5 % (мас./об.)) превращались в газонаполненные МП (БСА МП, БСА@П(ВП-АК) МП, БСА@ПАм МП).

Соответственно, для всех исследованных систем была использована единая схема получения микропузырьков. На первом этапе формировали белково-композитные комплексы путём смешения раствора БСА с амфифильными сополимерами П(ВП-АК) различной молекулярной массы и архитектуры либо с низкомолекулярным спермином. После выдержки при 50 °С сформированные комплексы подвергали ультразвуковой обработке (20 кГц, 100 Вт), в результате которой происходило образование газонаполненных микропузырьков.

Количественный анализ БСА@ПАм МП показал, что введение спермина приводит к существенному увеличению концентрации микропузырьков по сравнению с БСА МП. Для БСА МП концентрация составляла около 2×10^8 МП/мл, тогда как для БСА@ПАм МП она достигала порядка 2×10^{10} МП/мл. При этом средний диаметр БСА@ПАм МП существенно не отличался от БСА МП и составлял около 0,8 мкм, что свидетельствует о преимущественном влиянии спермина на эффективность формирования микропузырьков, а не на их размер.

3.4.6. Структурная организация белка в оболочке микропузырьков

Предыдущие разделы показали, что состав белково-композитных систем определяет эффективность формирования микропузырьков, их концентрацию, морфологию и толщину оболочки. Однако полученные результаты не позволяют установить, в каком структурном состоянии находится белок после формирования межфазной оболочки.

Данный вопрос имеет принципиальное значение, поскольку степень сохранности нативной структуры белка определяет биосовместимость материала, его склонность к агрегации и поведение в биологических средах. Вместе с тем в литературе образование белковых микропузырьков нередко связывают с глубокой денатурацией альбумина, предполагая, что межфазная оболочка формируется преимущественно из существенно развернутых белковых молекул [3, 241, 242]. В то же время полученные в настоящей работе данные о формировании устойчивых белково-полимерных комплексов и их сохранении после ультразвуковой обработки позволяют предположить, что белок в составе оболочки сохраняет преимущественно нативоподобную структуру.

Для проверки данного предположения было проведено последовательное исследование структурного состояния БСА в исходном растворе, белково-полимерных комплексах, исходных и отмытых микропузырьках, а также после разрушения их оболочки терапевтическим ультразвуком. Такой подход позволил определить, какие белковые фракции преимущественно участвуют в формировании межфазного слоя и сопровождается ли этот процесс глубокой денатурацией.

Для решения поставленной задачи использовали два взаимодополняющих метода – спектроскопия кругового дихроизма и ИК-Фурье. Их совместное применение позволило оценить степень сохранности вторичной структуры белка, выявить признаки частичной денатурации и

установить наличие или отсутствие агрегированных β -структур в составе оболочки микропузырьков.

При анализе спектров кругового дихроизма (рис 3.26) использовали не непосредственно значения эллиптичности, а безразмерный фактор диссимметрии g , позволяющий корректно сравнивать образцы с различной концентрацией и оптической плотностью. Фактор диссимметрии определяется как отношение разности коэффициентов поглощения лево- и правополяризованного света к их среднему значению:

$$g = \frac{A_L - A_P}{\frac{1}{2}(A_L + A_P)} = \frac{\Delta A}{A} \quad (3.5)$$

где A_L и A_P – коэффициенты поглощения для лево- и правополяризованного света, соответственно.

В отличие от молярной эллиптичности, фактор диссимметрии практически не зависит от концентрации белка и длины оптического пути, что делает его более устойчивым параметром при исследовании неоднородных систем, включая суспензии микропузырьков, для которых вклад светорассеяния может существенно искажать абсолютные значения кругового дихроизма.

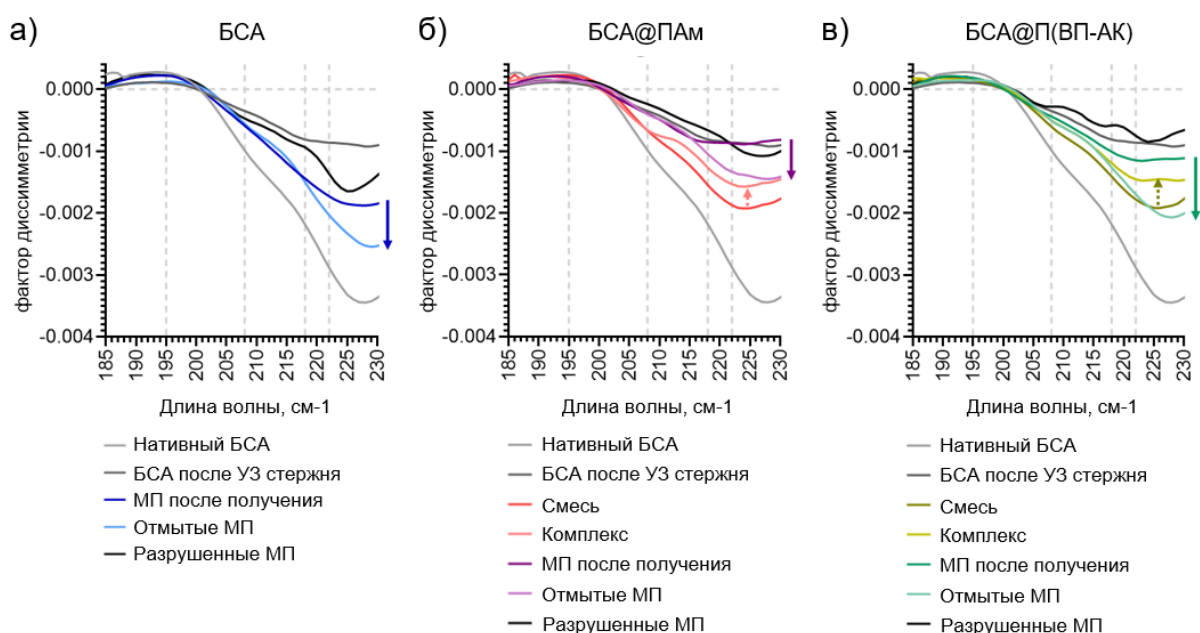


Рисунок 3.26. Зависимость фактора диссиметрии от длины волны, полученная методом кругового дихроизма в диапазоне 185–230 нм. а) БСА и соответствующие БСА МП; б) БСА в присутствии низкомолекулярной добавки ПАм и соответствующие БСА@ПАм МП; в) БСА в присутствии макромолекулярной добавки П(ВП-АК) и соответствующие БСА@П(ВП-АК) МП. Сплошными стрелками показаны изменения спектров при переходе от неотмытых к отмытым микропузырькам, пунктирными – при переходе от свободного БСА к его комплексам с добавками.

Спектры регистрировали в диапазоне 185–230 нм, поскольку именно в этой области обеспечивается оптимальное отношение сигнал/шум при сохранении высокой чувствительности к изменениям вторичной структуры белка, включая вклад α -спиралей, β -структур и неупорядоченных участков [243, 244]. Выбор данного диапазона соответствует современным рекомендациям по анализу спектров кругового дихроизма белков.

В качестве референтных образцов использовали нативный БСА и БСА после ультразвуковой обработки в течение 10 мин без температурного контроля. Для систем с добавками исследовали смеси до завершения комплексообразования и сформированные белково-добавочные комплексы. Для микропузырьков анализировали исходные суспензии, отмытые микропузырьки после удаления растворённых фракций и избытка реагентов, а также образцы после разрушения оболочки терапевтическим ультразвуком.

Как видно из рисунка 3.26а, нативный БСА характеризовался спектром, типичным для глобулярного белка с высоким содержанием α -спиральной структуры. Для него наблюдался равномерно убывающий профиль фактора диссиметрии, выраженный отрицательный минимум в области 226–227 нм и амплитуда около $-0,0035$. Данный минимум традиционно связывают с электронными $\pi \rightarrow \pi^*$ переходами в α -спиральных участках полипептидной цепи, тогда как форма спектра в области 195–225 нм отражает степень сохранности вторичной структуры белка. Поэтому спектр нативного БСА использовали в качестве структурного эталона.

После ультразвуковой обработки спектральный профиль БСА существенно изменялся: минимум смещался в область 218–220 нм, его глубина уменьшалась примерно до $-0,0008$, а участок выше 215 нм становился практически плоским. Подобные изменения характерны для частично денатурированных белков и свидетельствуют о снижении доли α -спиральных элементов при сохранении общей организации белковой глобулы [245, 246]. При этом отсутствие выраженных особенностей в области 228–230 нм указывает на отсутствие формирования агрегированных β -структур.

Спектры БСА МП занимали промежуточное положение между нативным и обработанным ультразвуком БСА (рис. 3.26а). Для исходной суспензии минимум располагался около 222 нм при амплитуде порядка $-0,0017$, тогда как после отмывки он углублялся до $-0,0021$. Полученные результаты свидетельствуют о том, что формирование оболочки сопровождается лишь частичной перестройкой вторичной структуры белка. Увеличение глубины минимума после отмывки, вероятно, связано с удалением растворимых белковых фракций, не вошедших в состав оболочки микропузырьков.

После разрушения БСА МП терапевтическим ультразвуком спектр сохранял минимум в области 220–222 нм с амплитудой около $-0,0015$, что соответствует частично денатурированному состоянию без признаков образования агрегированных β -структур [245].

Анализ системы БСА@ПАм (рис. 3.26б) выявил более выраженные изменения спектрального профиля. Уже для исходной смеси наблюдалось уменьшение амплитуды минимума и ослабление характерной α -спиральной сигнатуры, что отражает изменение конформационного состояния белка при взаимодействии с полиамином [246]. После завершения комплексообразования данные изменения усиливались: снижалась интенсивность сигнала и появлялось плечо в области 205–215 нм, свидетельствующее о дальнейшем перераспределении элементов вторичной структуры.

Формирование БСА@ПАм МП сопровождалось дополнительным уменьшением амплитуды спектра до $-0,0009$ и практически полным исчезновением выраженного минимума. После отмывки наблюдалось частичное восстановление спектрального профиля, однако он оставался существенно отличным от спектра нативного БСА. После разрушения оболочки спектр становился практически линейным, при этом признаки образования агрегированных β -структур отсутствовали.

Для системы БСА@П(ВП-АК) (рис. 3.26в) наблюдалась иная динамика изменений спектров. Уже на стадии смешения компонентов сохранялся характерный спектральный профиль нативного БСА с минимумом в области 226–227 нм, что свидетельствует о сохранении преимущественно α -спиральной структуры белка. После формирования белково-полимерного комплекса изменения носили умеренный характер и не сопровождались существенной потерей нативоподобной организации БСА.

Для БСА@П(ВП-АК) МП минимум спектра сохранялся в области около 225 нм, а после отмывки его глубина увеличивалась. Это свидетельствует о том, что при формировании оболочки происходит лишь частичная перестройка вторичной структуры белка, тогда как основная доля белковых молекул сохраняет нативоподобную конформацию. Увеличение глубины минимума после отмывки, вероятно, связано с удалением растворимых белковых фракций, не вошедших в состав оболочки микропузырьков. Даже после разрушения оболочки терапевтическим ультразвуком спектр оставался более выраженным по сравнению с образцом БСА после ультразвуковой обработки, что свидетельствует о сохранении остаточной хиральной организации белка.

Таким образом, анализ спектров кругового дихроизма (рис. 3.26а–в) показал, что отмывка микропузырьков приводит к увеличению доли структурно упорядоченного белка в исследуемой фракции, тогда как разрушение оболочки сопровождается лишь частичной конформационной перестройкой без признаков образования агрегированных β -структур.

Наиболее высокая степень сохранности вторичной структуры БСА наблюдалась в системе БСА@П(ВП-АК), что согласуется с ранее полученными результатами ИК-Фурье спектрами, рамановской спектроскопии и молекулярно-динамического моделирования, свидетельствующими о формировании устойчивых белково-полимерных комплексов без глубокой денатурации белка.

Для независимой оценки структурного состояния белка был проведён анализ тех же серий образцов методом ИК-Фурье спектроскопии. (рис. 3.27)

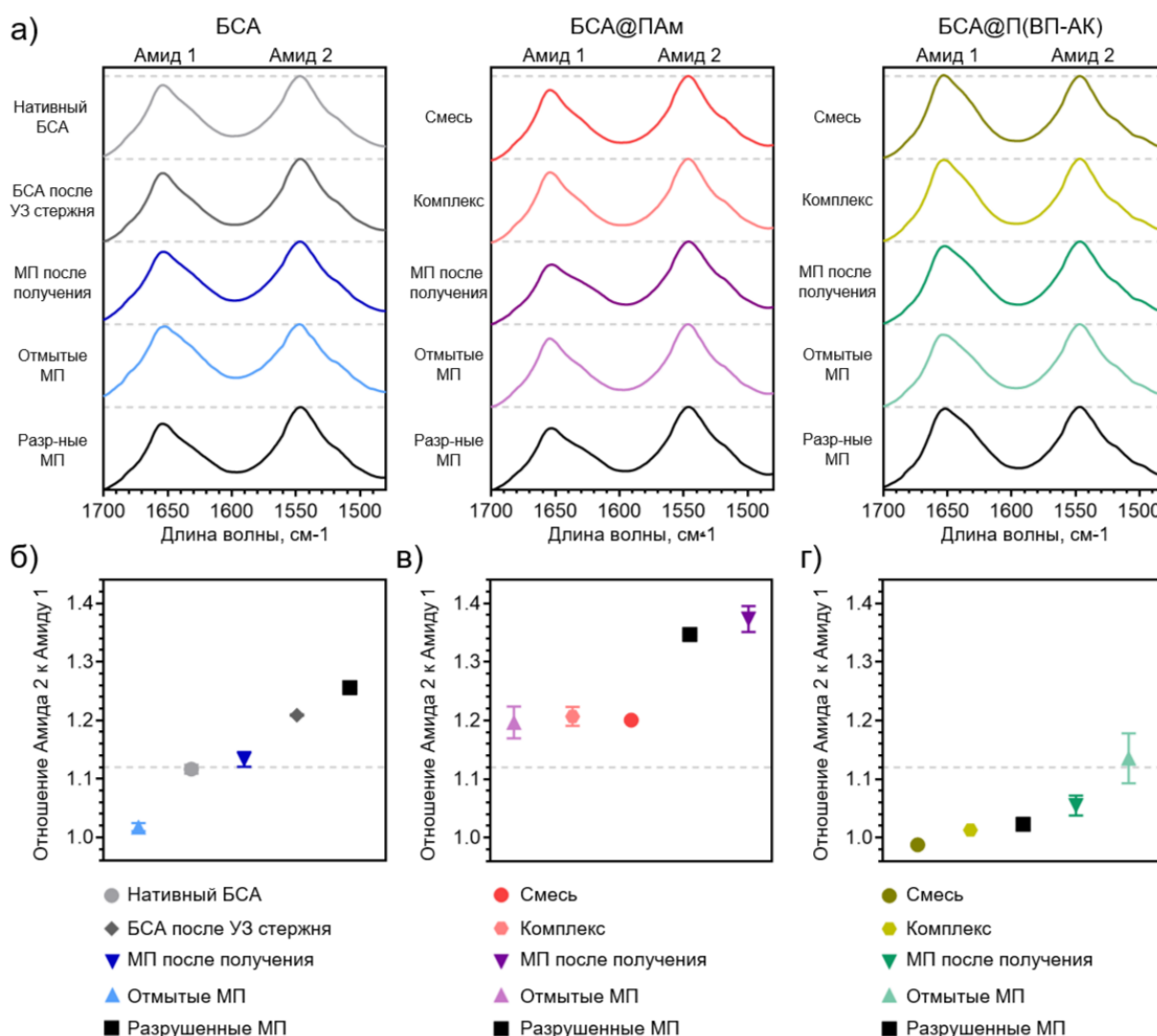


Рисунок 3.27. Анализ ИК-Фурье спектров нативного БСА, его комплексов с добавками и соответствующих микропузырьков. а) Репрезентативные ИК-

Фурье спектры всех исследованных образцов с указанием характеристических полос Амид I и Амид II; пунктирными линиями

обозначен уровень интенсивности полосы Амид II. б–г) Отношение интенсивностей полос Амид II/Амид I: б) нативный БСА, БСА после ультразвуковой обработки и БСА МП; в) смеси БСА с низкомолекулярной добавкой ПАм, соответствующие комплексы и БСА@ПАм МП; г) смеси БСА с П(ВП-АК), соответствующие комплексы и БСА@П(ВП-АК) МП.

Пунктирной линией показано среднее значение отношения Амид II/Амид I для нативного БСА.

Как видно из рисунка 3.27а, спектр нативного БСА характеризовался двумя основными полосами – Амид I около 1652 см^{-1} и Амид II около 1545 см^{-1} , что соответствует белку с преобладающим содержанием α -спиральных элементов. Отношение интенсивностей полос Амид II/Амид I (рис. 3.27 б) составляло около 1,12, что хорошо согласуется с литературными данными для нативного альбумина [247, 248].

После ультразвуковой обработки положение основных полос практически не изменялось, а интенсивность полосы Амид I уменьшалась незначительно. При этом в области $1610\text{--}1625\text{ см}^{-1}$, характерной для агрегированных β -структур, дополнительные полосы не появлялись. Следовательно, ультразвуковая обработка сопровождалась лишь частичной перестройкой вторичной структуры БСА без формирования агрегированных белковых состояний.

При формировании БСА@ПАм МП наблюдаемые изменения усиливались: отношение Амид II/Амид I достигало 1,37 (рис. 3.27 в), а полоса Амид I приобретала выраженную асимметрию в области $1630\text{--}1610\text{ см}^{-1}$. Это свидетельствует о более значительной конформационной перестройке белка при формировании межфазной оболочки. После отмывки микропузырьков отношение Амид II/Амид I уменьшалось примерно до 1,20, приближаясь к значениям, характерным для белково-добавочных комплексов, тогда как после разрушения оболочки вновь возрастало. Полученные результаты показывают, что в системе БСА@ПАм структурное состояние белка в значительной

степени определяется локальным окружением и условиями формирования межфазного слоя.

Для системы БСА@П(ВП-АК) наблюдалась существенно более высокая структурная стабильность белка (рисунок 3.27г). Во всех исследованных состояниях полоса Амид I сохраняла положение в диапазоне $1650\text{--}1655\text{ см}^{-1}$, характерном для α -спиральной структуры. Перераспределение интенсивности в область $1630\text{--}1610\text{ см}^{-1}$ было выражено слабо, а признаки формирования агрегированных β -структур отсутствовали. Отношение Амид II/Амид I для смесей, белково-полимерных комплексов и микропузырьков после разрушения оболочки оставалось практически неизменным ($1,00\text{--}1,02$), тогда как для отмытых микропузырьков увеличивалось до $1,12$, приближаясь к значению нативного БСА. Полученные результаты свидетельствуют о том, что взаимодействие БСА с П(ВП-АК) не сопровождается выраженной перестройкой вторичной структуры белка и обеспечивает более высокую степень её сохранности по сравнению с системой БСА@ПАм.

Для количественной оценки изменений вторичной структуры белка была выполнена деконволюция полосы Амид I по методике, описанной в разделе 3.4.4 (рис. 3.24). Разложение спектров проводили в программном обеспечении OPUS (Bruker), а относительное содержание α -спиралей, β -структур, β -поворотов и неупорядоченных участков определяли по площади соответствующих гауссовых компонент.

Степень структурных изменений оценивали по параметру относительной потери α -спиральной структуры D, рассчитываемому по выражению (3.4). Следует отметить, что данный параметр использовали как количественную меру отклонения вторичной структуры белка от исходного состояния, а не как показатель полной денатурации.

Для системы БСА@П(ВП-АК) ОМ с $M_n = 8,5\text{ кДа}$ содержание α -спиральных элементов оставалось близким к исходному БСА во всех исследованных состояниях. Для смеси содержание α -спиралей составляло 50 %, для комплекса – 48 %, для микропузырьков – 48 %, для отмытых

микропузырьков – 49 %, а после разрушения оболочки – 47 %. (таб. 3.3) Соответствующая относительная степень структурных изменений составляла 0, 4, 4, 2 и 6 %. Одновременно наблюдалось увеличение вклада β -структур с 40 % для исходного БСА до 46 – 50 %, тогда как содержание неупорядоченных участков уменьшалось с 10 % до 1–6 %. Таким образом, взаимодействие БСА с П(ВП-АК) сопровождалось преимущественно перераспределением элементов вторичной структуры и уменьшением доли неупорядоченных участков без существенной потери α -спиральной организации. Полученные результаты согласуются с отсутствием выраженных изменений положения полосы Амид I и подтверждают стабилизирующее действие сополимера на структуру белка.

Для системы БСА@ПАм изменения были более выраженными. Уже на стадии смешения содержание α -спиралей снижалось до 42 %, что соответствовало относительной степени структурных изменений около 16 %. В комплексе содержание α -спиральных элементов составляло 44 % (D 12 %). Наиболее выраженные изменения наблюдались для неотмытых микропузырьков, где содержание α -спиралей уменьшалось до 35 %, а доля неупорядоченных участков возрастала до 32 %, что соответствовало относительной степени структурных изменений около 30 %. После отмывки микропузырьков содержание α -спиралей увеличивалось до 49 % (D 2 %), а после разрушения оболочки составляло 48 % (D 4 %). Одновременно происходило уменьшение доли неупорядоченных участков до 4–6 % и увеличение вклада β -структур до 46–48 %. Полученные данные свидетельствуют о том, что структурное состояние БСА в системе с ПАм существенно зависит от локального окружения белка и условий его организации на межфазной границе.

Таким образом, результаты деконволюции полосы Амид I полностью подтверждают выводы, полученные при анализе отношения Амид II/Амид I. Для системы БСА@П(ВП-АК) относительная степень структурных изменений белка во всех исследованных состояниях не превышала 10 %, что

свидетельствует о сохранении преимущественно нативоподобной структуры БСА. В системе БСА@ПАм значения параметра D для смесей и белково-добавочных комплексов достигали 30 %, отражая более выраженную конформационную перестройку белка. Следует отметить, что спектры неотмытых микропузырьков вносят существенный вклад не только сигналы оболочек микропузырьков, но и белково-добавочных комплексов, остающихся в дисперсионной среде после синтеза. Поэтому значения D, полученные для неотмытых микропузырьков, преимущественно характеризуют структурное состояние комплексов, тогда как анализ отмытых микропузырьков, содержащих практически только оболочки микропузырьков, показывает, что нарушение конформации БСА в составе межфазной оболочки не превышает 10 % независимо от природы исследуемой добавки. При этом во всех исследованных системах отсутствовали признаки формирования агрегированных β -структур в области $1610\text{--}1625\text{ см}^{-1}$, что свидетельствует об отсутствии глубокой денатурации и необратимой агрегации белка.

Таблица 3.3. Результаты деконволюции полосы Амид I ИК-ФУРЬЕ спектров систем БСА, БСА@П(ВП-АК) и БСА@ПАм.

Образец	α -спирали, %	β -структуры, %	Неупорядоч., %	D, %
БСА	50	40	10	0
БСА@П(ВП-АК) ОМ 8,5 кДа				
Смесь	50	49	2	0
Комплекс	48	46	6	4
МП	48	50	2	4
Отмытые МП	49	50	1	2
Разрушенные МП	47	50	3	6

БСА@ПАм				
Смесь	42	38	20	16
Комплекс	44	39	17	12
МП	35	32	32	30
Отмытые МП	49	47	4	2
Разрушенные МП	48	48	4	4

Таким образом, результаты ИК-Фурье спектроскопии (рис. 3.26а–г) полностью согласуются с данными спектроскопии кругового дихроизма. Взаимодействие БСА с ПАм сопровождалось более выраженной перестройкой вторичной структуры уже на стадии комплексообразования, тогда как система БСА@П(ВП-АК) характеризовалась высокой степенью сохранности нативоподобной структуры белка как в растворе, так и в составе микропузырьков. Для обеих систем после отмывки микропузырьков спектральные параметры смещались в сторону значений нативного БСА, что свидетельствует о преимущественном включении в состав межфазной оболочки наиболее структурно сохраненных белковых фракций.

Совместный анализ данных спектроскопии кругового дихроизма и ИК-Фурье показал, что формирование белково-композитной оболочки не сопровождается глубокой денатурацией БСА. Нарушение конформации белка в составе белково-композитных комплексов может достигать 30 %, тогда как в оболочке отмытых микропузырьков не превышает 10 %. При этом во всех исследованных системах отсутствовали признаки формирования агрегированных β -структур, что свидетельствует о сохранении преимущественно нативоподобной организации белка.

Полученные результаты показывают, что структурное состояние белка в оболочке определяется природой модифицирующей добавки и особенностями формирования белково-композитных комплексов.

Макромолекулярный сополимер П(ВП-АК) обеспечивает более высокую степень сохранности вторичной структуры БСА по сравнению с низкомолекулярным ПАм, что согласуется с результатами молекулярно-динамического моделирования и исследований белково-полимерных комплексов.

В разделе 3.4 установлено, что состав белково-композитных систем определяет эффективность формирования микропузырьков, их концентрацию, морфологические характеристики и структурную организацию белка в составе межфазной оболочки. Вместе с тем полученные результаты не позволяют объяснить механизмы, лежащие в основе выявленных различий на стадии ультразвукового синтеза. В связи с этим следующим этапом исследования стало изучение кавитационной динамики формирования микропузырьков, включая анализ интенсивности кавитации и характеристик газонаполненных предшественников, возникающих в процессе соникации.

3.5 Кавитационная динамика формирования микропузырьков и её связь с составом белково-композитных систем

Результаты, представленные в разделе 3.4, показали, что состав белково-композитных систем определяет концентрацию, морфологию и структуру оболочки микропузырьков, а также степень сохранности вторичной структуры белка. Вместе с тем проведённые исследования характеризуют преимущественно исходное состояние белково-композитных комплексов и конечные свойства сформированных микропузырьков, не позволяя проследить процессы, протекающие непосредственно в ходе ультразвукового синтеза.

Формирование микропузырьков происходит в условиях акустической кавитации, где непрерывно реализуются процессы зарождения, роста, взаимодействия, коллапса и стабилизации газонаполненных объектов. Именно динамика этих процессов определяет вероятность образования устойчивых микропузырьков и эффективность формирования их белково-композитной

оболочки. Поэтому следующим этапом работы стало исследование кавитационной динамики непосредственно в процессе ультразвукового воздействия с использованием высокоскоростной видеорегистрации и кавитометрии.

3.5.1. Подход к анализу динамики формирования микропузырьков

Для регистрации и количественного анализа динамики формирования микропузырьков использовали высокоскоростную видеосъёмку с последующей автоматизированной обработкой полученных изображений. Анализировали не только сформированные микропузырьки, но и возникающие в процессе соникации газонаполненные предшественники микропузырьков (пМП), представляющие собой короткоживущие пузырьковые структуры, часть которых стабилизируется белково-композитной оболочкой и переходит в устойчивые микропузырьки.

Принципиально важным являлось не только обнаружение отдельных объектов на последовательности кадров, но и их корректное отслеживание во времени. Такой подход позволил определить время жизни, размеры, траектории движения и особенности эволюции отдельных пМП, а также сопоставить эти параметры с интенсивностью кавитации и составом исследуемых белково-композитных систем.

С этой целью была реализована схема автоматизированного анализа видеоданных, представленная на рисунке 3.28а.

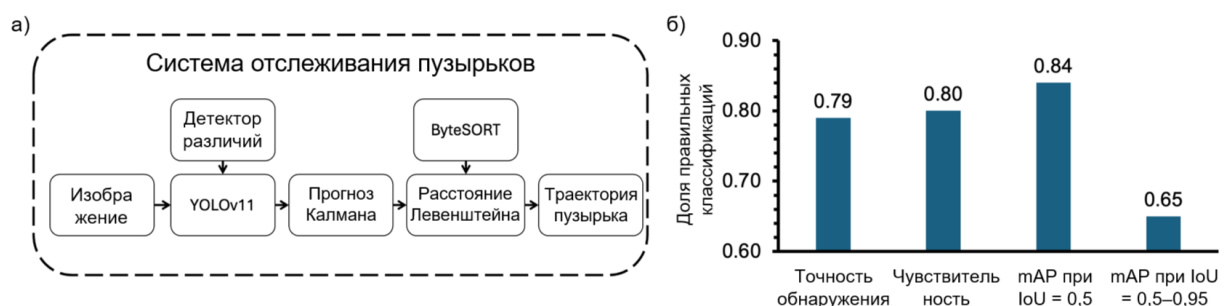


Рисунок 3.28. Оценка эффективности системы отслеживания газонаполненных предшественников микропузырьков.

а) Схема обработки видеоданных: входное изображение, обнаружение

объектов на основе нейросетевой модели (YOLOv11) с уточнением по межкадровым различиям, прогноз положения с использованием фильтра Калмана, сопоставление объектов по расстоянию Левенштейна и итоговая идентификация траекторий с применением алгоритма ByteTrack (ByteSORT).

б) Количественные показатели качества распознавания и отслеживания: точность ($\text{precision} = 0,79$), полнота ($\text{recall} = 0,80$), средняя точность при пороге 0,5 ($\text{mAP50} = 0,84$) и интегральный показатель точности ($\text{mAP50-95} = 0,65$).

Обработка видеопоследовательностей включала обнаружение газонаполненных предшественников микропузырьков с использованием нейросетевой модели YOLOv11, уточнение их положения на основе межкадровых изменений изображения, прогноз координат объектов с помощью фильтра Калмана и последующее объединение обнаружений в непрерывные траектории алгоритмом ByteTrack.

Использование алгоритма множественного отслеживания позволило корректно идентифицировать один и тот же объект на последовательных кадрах даже при его кратковременном исчезновении из области наблюдения или потере фокуса. Такой подход особенно важен при анализе кавитационных процессов, характеризующихся высокой скоростью движения газонаполненных объектов, их взаимодействием и малым временем существования.

Качество разработанной системы оценивали по стандартным метрикам обнаружения и отслеживания объектов (рис. 3.28б). Полученные значения $\text{precision} = 0,79$ и $\text{recall} = 0,80$ свидетельствуют о сбалансированном обнаружении объектов без существенного числа ложноположительных или пропущенных детекций. Высокое значение $\text{mAP50} = 0,84$ подтверждает корректность локализации газонаполненных предшественников микропузырьков, тогда как показатель $\text{mAP50-95} = 0,65$ указывает на сохранение высокой точности алгоритма и при более строгих критериях оценки.

Соответственно, разработанный подход обеспечил автоматизированное количественное описание кавитационного процесса, позволив определять размеры, время существования, траектории движения и количество газонаполненных предшественников микропузырьков. Полученные параметры были использованы для последующего анализа влияния состава белково-композитных систем на динамику формирования микропузырьков.

3.5.2. Кавитационная активность и формирование предшественников микропузырьков

Перед анализом динамики формирования микропузырьков была проведена оценка стабильности параметров ультразвукового воздействия. Как показано на рисунке 3.29а, в течение всего эксперимента мощность ультразвукового излучения (68 Вт/см^2), частота (20 кГц) и температура раствора ($23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) оставались стабильными. Это подтверждает воспроизводимость условий синтеза и позволяет исключить влияние параметров ультразвуковой установки на наблюдаемые различия между исследуемыми системами.

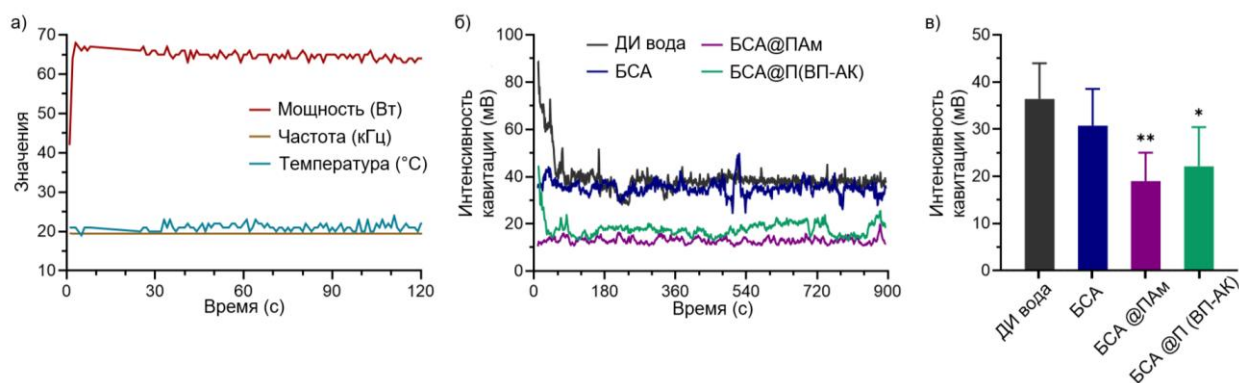


Рисунок 3.29. Оценка кавитационной активности в условиях, моделирующих синтез микропузырьков. а) Изменение мощности ультразвукового воздействия, частоты и температуры раствора в процессе обработки. б) Временные зависимости интенсивности кавитации для деионизированной воды (чёрный), раствора БСА (синий), БСА@ПАМ (пурпурный) и БСА@П(ВП-АК) (зелёный); измерения выполнены при одинаковом

положении сонотрода и датчика. в) Средние значения интенсивности кавитации для исследованных систем.

Далее исследовали интенсивность кавитации в различных системах (рисунок 3.29б, в). Оценку проводили методом кавитометрии, основанным на регистрации акустических сигналов, возникающих под действием первичного ультразвукового поля и кавитационных событий в жидкости, с последующим интегрированием сигнала в широком диапазоне частот [249]. В качестве контрольного образца использовали деионизированную воду, не содержащую компонентов, способных стабилизировать газонаполненные структуры.

Показано, что в деионизированной воде наблюдалась наибольшая интенсивность кавитации. Введение БСА приводило к её умеренному снижению, тогда как присутствие белково-композитных систем БСА@ПАм и БСА@П(ВП-АК) сопровождалось существенным подавлением кавитационной активности. Полученные результаты согласуются с литературными данными о влиянии поверхностно-активных и полимерных добавок на динамику акустической кавитации. Средние значения сигнала составляли $36,4 \pm 7,6$ мВ для деионизированной воды, $30,7 \pm 7,8$ мВ для раствора БСА и снижались до $19,0 \pm 6,0$ мВ и $22,1 \pm 8,3$ мВ для систем БСА@ПАм и БСА@П(ВП-АК) соответственно (рис. 3.29в).

Полученные данные свидетельствуют о наличии обратной зависимости между интенсивностью кавитации и концентрацией формирующихся микропузырьков (раздел 3.4): системы, характеризующиеся меньшей кавитационной активностью, обеспечивали более высокий выход микропузырьков. Следовательно, определяющим фактором эффективности синтеза является не максимальная интенсивность кавитации, а условия, обеспечивающие образование и стабилизацию газонаполненных предшественников. (рис. 3.30)

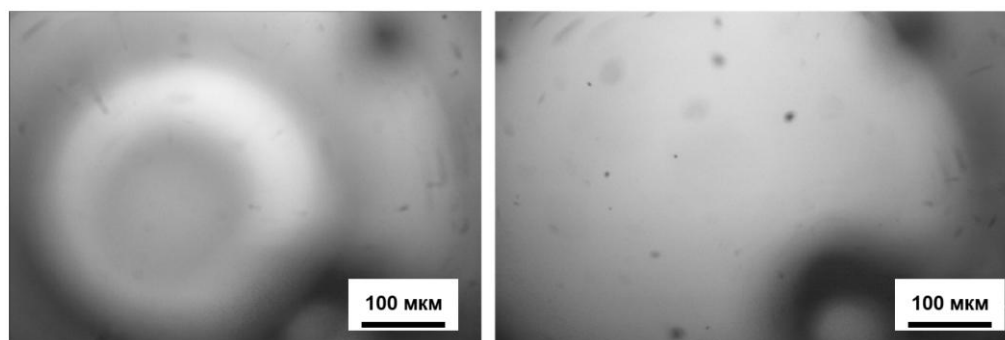


Рисунок 3.30. Пример последовательности кадров высокоскоростной съёмки, иллюстрирующих имплозию кавитационного пузырька в деионизированной воде в течение 20 циклов колебаний. Интервал между кадрами составляет 100 мкс. Слева показан пузырёк в процессе коллапса, справа – после его разрушения.

Наблюдаемое снижение кавитационной активности может быть частично обусловлено уменьшением поверхностного натяжения вследствие поверхностно-активных свойств БСА и исследуемых добавок [179]. Однако совокупность полученных результатов указывает на более сложный механизм изменения кавитационной динамики.

В деионизированной воде преобладали процессы интенсивного коллапса кавитационных пузырьков, сопровождавшиеся высвобождением энергии в виде ударных волн и микроструй, характерных для инерционной кавитации [22]. Это подтверждается данными высокоскоростной видеосъёмки (рис. 3.30), на которой регистрировалась характерная имплозия пузырьков. В присутствии БСА и, особенно, белково-композитных систем доля подобных разрушительных событий уменьшалась.

Полученные результаты позволяют предположить, что часть кавитационных пузырьков не проходит стадию полного коллапса, а переходит в относительно стабильные пМП, формирующиеся на стадиях нуклеации и быстрого роста пузырьков в акустическом поле. При наличии белково-композитной оболочки такие структуры могут стабилизироваться и переходить в устойчивые микропузырьки [2, 248]. Таким образом, введение белково-композитных систем сопровождалось перераспределением

кавитационной динамики: уменьшался вклад инерционной кавитации и возрастала вероятность стабилизации газонаполненных предшественников.

Следует отметить, что полученные результаты основаны на анализе поведения пузырьков непосредственно в объеме раствора в процессе ультразвукового воздействия, без их фиксации или удержания. В отличие от большинства опубликованных работ, где механизмы образования и разрушения микропузырьков исследовали для одиночных объектов, удерживаемых акустическими или оптическими ловушками, в настоящей работе анализ проводили в динамически неравновесной системе, где одновременно протекали процессы зарождения, роста, слияния, разделения и разрушения пузырьков.

Поэтому предложенный механизм формирования предшественников микропузырьков следует рассматривать как рабочую модель, основанную на совокупности прямых экспериментальных наблюдений и количественного анализа. Несмотря на сложность исследуемой системы, полученные результаты позволяют связать снижение кавитационной активности с переходом в режим, благоприятный для стабилизации газонаполненных предшественников и последующего формирования устойчивых микропузырьков.

Соответственно, снижение интенсивности кавитации следует рассматривать не как признак уменьшения эффективности ультразвукового воздействия, а как показатель перераспределения кавитационной динамики в сторону процессов, способствующих образованию устойчивых микропузырьков. Для проверки этого предположения на следующем этапе был выполнен количественный анализ времени существования, размеров и эволюции газонаполненных предшественников микропузырьков.

3.5.3. Размерные характеристики предшественников микропузырьков и их эволюция в кавитационном поле

Для уточнения механизма формирования микропузырьков был проведён анализ распределения размеров газонаполненных предшественников, регистрируемых в процессе ультразвукового воздействия (рис. 3.31 а–г).

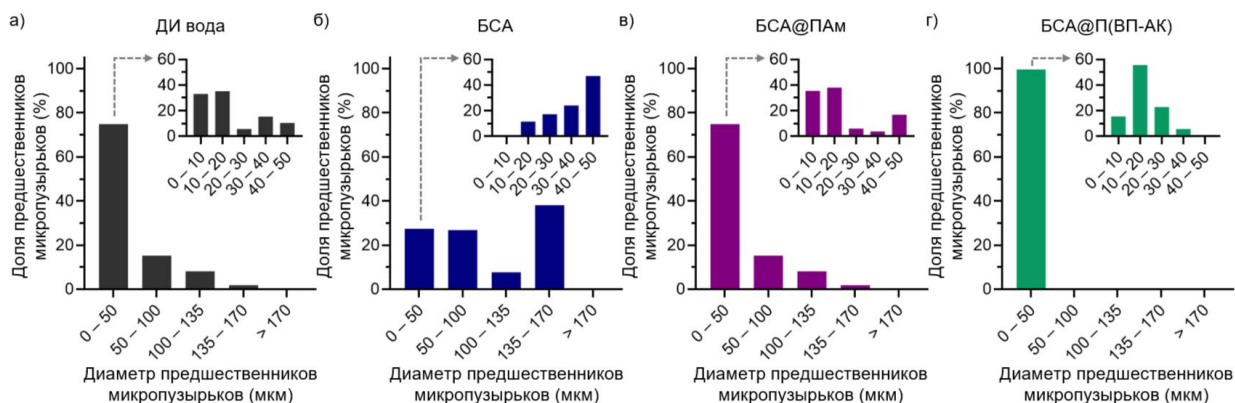


Рисунок 3.31. Накопленные распределения размеров предшественников микропузырьков в различных средах. а) Деионизированная вода. б) БСА. в) БСА@ПАм. г) БСА@П(ВП-АК).

Репрезентативные изображения, полученные методом высокоскоростной видеосъёмки, приведены на рисунке 3.32.

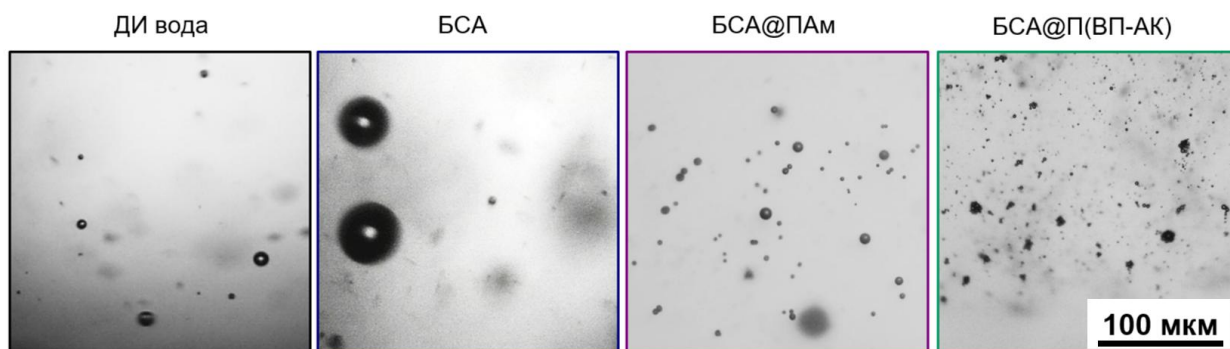


Рисунок 3.32. Репрезентативные кадры высокоскоростной видеосъёмки предшественников микропузырьков в различных средах: деионизированная вода (чёрный), БСА (синий), БСА@ПАм (пурпурный) и БСА@П(ВП-АК) (зелёный). Период ультразвукового воздействия определяется как $T = 1/f$, период колебаний формы пузырьков составляет около 1 мс. Съёмка выполнена со скоростью 1000 кадров/с при разрешении 768×768 пикселей. Масштабные линейки – 100 мкм.

Съёмку проводили со скоростью 1000 кадров/с, поэтому интервал между соседними кадрами составлял 1 мс. При частоте ультразвукового воздействия 20 кГц период акустических колебаний, определяемый как $T = 1/f$, равен 50 мкс. Следовательно, между двумя последовательными кадрами проходило около 20 периодов ультразвуковой волны. Наблюдаемые на видеозаписи изменения характеризуют не отдельные циклы акустического воздействия, а более медленную эволюцию формы, размеров и положения предшественников микропузырьков с временным разрешением 1 мс.

В деионизированной воде (рис. 3.31а) преобладали предшественники диаметром менее 50 мкм, доля которых достигала 75 %. Эти структуры характеризовались высокой динамической неустойчивостью и склонностью к коллапсу, что согласуется с данными высокоскоростной видеосъёмки (рисунок 2.30), демонстрирующими имплозию кавитационных пузырьков. В данных условиях процессы разрушения преобладали над процессами стабилизации.

В присутствии БСА распределение смещалось в область больших размеров (рис. 3.31б), а доля предшественников диаметром менее 20 мкм существенно уменьшалась. Это может быть связано с быстрым разрушением малых газонаполненных структур либо с их переходом в более крупные пузырьки вследствие роста и слияния. При этом наличие БСА обеспечивало частичную стабилизацию межфазной границы, однако было недостаточным для формирования значительной доли устойчивых предшественников малого размера.

Для системы БСА@ПАм (рис. 3.31в) распределение вновь смещалось в область малых размеров. Наибольший вклад вносили предшественники диаметром 0–10 и 10–20 мкм, что свидетельствует о стабилизации газонаполненных структур уже на ранних стадиях их существования.

Для системы БСА@П(ВП-АК) (рис. 3.31г) все зарегистрированные предшественники имели диаметр менее 50 мкм, а распределение характеризовалось выраженным максимумом в области 10–20 мкм. Такая

локализация размеров согласуется с высокой концентрацией микропузырьков, полученной для данной системы (раздел 3.4), и указывает на формирование условий, наиболее благоприятных для стабилизации газонаполненных предшественников.

Дальнейшая эволюция предшественников микропузырьков протекала в условиях непрерывного ультразвукового воздействия и определялась конкуренцией процессов роста, коалесценции, дробления и коллапса пузырьков. Анализ высокоскоростной видеосъёмки позволил выделить несколько характерных сценариев их поведения, зависящих от состава белково-композитной системы. Их обобщённая схема представлена на рисунке 3.33, а соответствующие последовательности кадров высокоскоростной съёмки. (рис. 3.34)

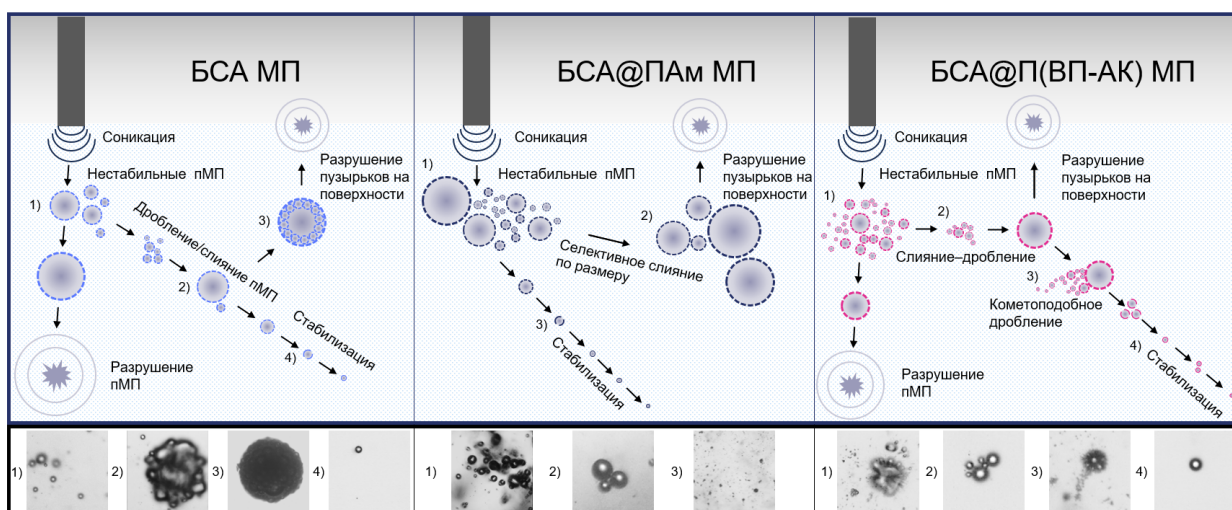


Рисунок 3.33. Схематическое представление механизмов формирования микропузырьков в различных белково-композитных системах. а) БСА МП – преобладание процессов коалесценции и коллапса; значительная часть предшественников разрушается как в объёме раствора, так и при всплытии, что ограничивает выход микропузырьков. б) БСА@ПАм МП – образование большого числа малых предшественников и их эффективная стабилизация, сопровождающиеся уменьшением роли разрушения и сужением распределения размеров. в) БСА@П(ВП-АК) МП – динамическое равновесие процессов коалесценции и дробления, сопровождающиеся

«кометоподобным» распадом пузырьков с образованием шлейфа из мелких газонаполненных структур..

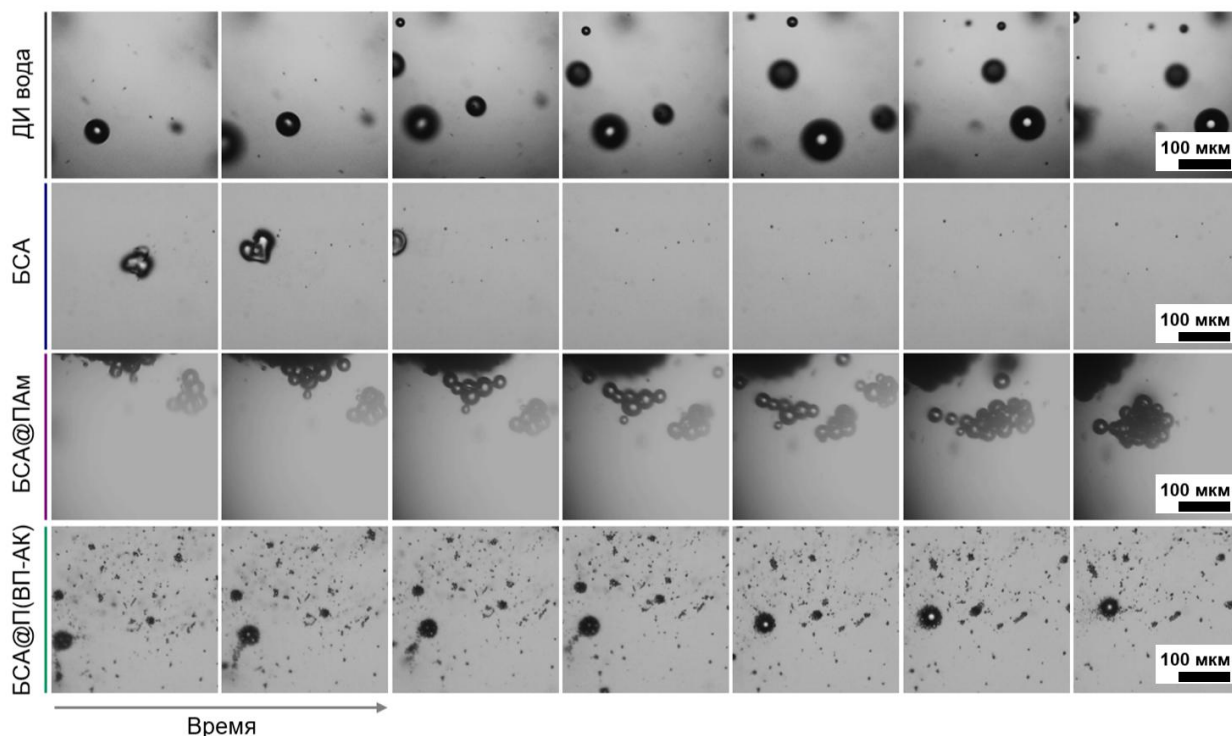


Рисунок 3.34. Репрезентативные последовательности кадров высокоскоростной видеосъёмки, иллюстрирующие эволюцию предшественников микропузырьков в различных средах: деионизированная вода (чёрный), БСА (синий), БСА@ПАм (пурпурный) и БСА@П(ВП-АК) (зелёный). Показаны характерные процессы роста, коалесценции, дробления и разрушения пузырьков. Съёмка выполнена со скоростью 1000 кадров/с при разрешении 768×768 пикселей. Масштабные линейки – 100 мкм.

Последовательности кадров, представленные на рисунке 3.34, демонстрируют характерные сценарии эволюции газонаполненных предшественников и служат экспериментальной основой для схемы механизмов формирования микропузырьков, приведённой на рисунке 3.33.

Система БСА характеризовалась выраженным дисбалансом указанных процессов (рис. 3.33а): значительная часть предшественников разрушалась как в объёме раствора, так и после всплытия к поверхности. В результате лишь небольшая доля пузырьков достигала стадии формирования устойчивой межфазной оболочки, что ограничивало общий выход микропузырьков.

Введение ПАм существенно изменяло характер эволюции предшественников (рис. 3.33б). В системе формировалось большое число пузырьков малого размера, которые быстро стабилизировались белково-композитной оболочкой и сравнительно редко вовлекались в процессы коалесценции. Это обеспечивало увеличение концентрации микропузырьков и сужение их размерного распределения.

Для системы БСА@П(ВП-АК) реализовывался иной механизм (рис. 3.33в). Крупные газонаполненные структуры существовали как динамические образования, непрерывно изменяющие свои размеры и форму. В процессе движения они поглощали встречающиеся нестабильные предшественники, после чего происходило последовательное отделение мелких пузырьков. При этом крупная структура не разрушалась полностью, а сохранялась как единый динамический объект, продолжая одновременно участвовать в процессах коалесценции и дробления. Формирующийся при этом шлейф из мелких пузырьков визуально напоминал хвост кометы. Под «кометоподобным» режимом в настоящей работе понимается именно такое состояние, при котором крупный пузырёк представляет собой динамическую систему, непрерывно перераспределяющую газ между собственной газовой фазой и окружающими предшественниками микропузырьков.

Несмотря на различие механизмов, обе белково-композитные системы обеспечивали значительное увеличение выхода микропузырьков по сравнению с БСА. Для БСА@ПАм этот эффект достигался преимущественно за счёт быстрой стабилизации большого числа независимо существующих предшественников малого размера, тогда как для БСА@П(ВП-АК), за счёт непрерывного перераспределения газа между пузырьками в условиях динамического равновесия процессов коалесценции и дробления.

Полученные результаты показывают, что эффективность формирования микропузырьков определяется не только интенсивностью кавитации, но и характером эволюции газонаполненных предшественников, который задаётся составом белково-композитной системы. При этом различные типы

модифицирующих добавок могут реализовывать принципиально разные механизмы повышения выхода микропузырьков, приводящие к сходному конечному результату.

3.6. Акустические характеристики белково-композитных микропузырьков *in vitro* и *in vivo*

На основании установленных ранее взаимосвязей между составом белково-композитных систем, структурой формируемых комплексов и параметрами микропузырьков (разделы 3.3–3.4), а также выявленных закономерностей их формирования в кавитационном поле (раздел 3.5) был осуществлён переход к исследованию акустических свойств полученных микропузырьков, определяющих возможность их применения в качестве ультразвуковых контрастных агентов.

В отличие от раздела 3.4, где оптимизация состава проводилась на основании морфологических и коллоидных характеристик микропузырьков, в настоящем разделе эффективность выбранных составов оценивалась по их акустическим свойствам. Такой подход позволил установить, соответствует ли область оптимальных составов, обеспечивающая высокий выход микропузырьков и контролируемое распределение по размерам, максимальной эффективности ультразвукового контрастирования.

Для установления влияния состава белково-композитной оболочки на акустические свойства микропузырьков было проведено исследование серии образцов, полученных с использованием сополимеров П(ВП-АК) с ОМ-концевой группой различной молекулярной массы при варьировании массового соотношения БСА:П(ВП-АК). Это позволило непосредственно сопоставить влияние состава межфазной оболочки на нелинейный акустический отклик и определить оптимальные условия формирования микропузырьков с точки зрения их функциональных характеристик.

Системы на основе сополимеров П(ВП-АК) с ОДМ-концевой группой на данном этапе не рассматривались. Как показано в разделе 3.4, они характеризовались менее выраженным увеличением концентрации микропузырьков, большей склонностью к агрегации и формированию объёмных белково-полимерных ассоциатов. Поскольку указанные особенности потенциально ограничивают эффективность ультразвукового контрастирования, дальнейшее исследование было сосредоточено на наиболее перспективной серии сополимеров с ОМ-концевой группой.

3.6.1. Нелинейный акустический отклик микропузырьков в модели сосуда

Для оценки акустического отклика микропузырьков в контролируемых условиях использовали модель кровеносного сосуда на основе желатинового фантома с каналом для циркуляции суспензии микропузырьков (рис. 3.35а). Подачу суспензии осуществляли с постоянной скоростью потока 2 мл/мин, а регистрацию ультразвукового сигнала с использованием клинической ультразвуковой системы с рабочей частотой 8 МГц.

Для корректного сопоставления образцов концентрацию всех суспензий приводили к одинаковому значению (1×10^8 МП/мл) и диспергировали в физиологическом растворе. Регистрацию проводили в В-режиме, характеризующем линейное акустическое рассеяние, и нелинейном контрастном режиме (НКР), позволяющем регистрировать нелинейный акустический отклик микропузырьков.

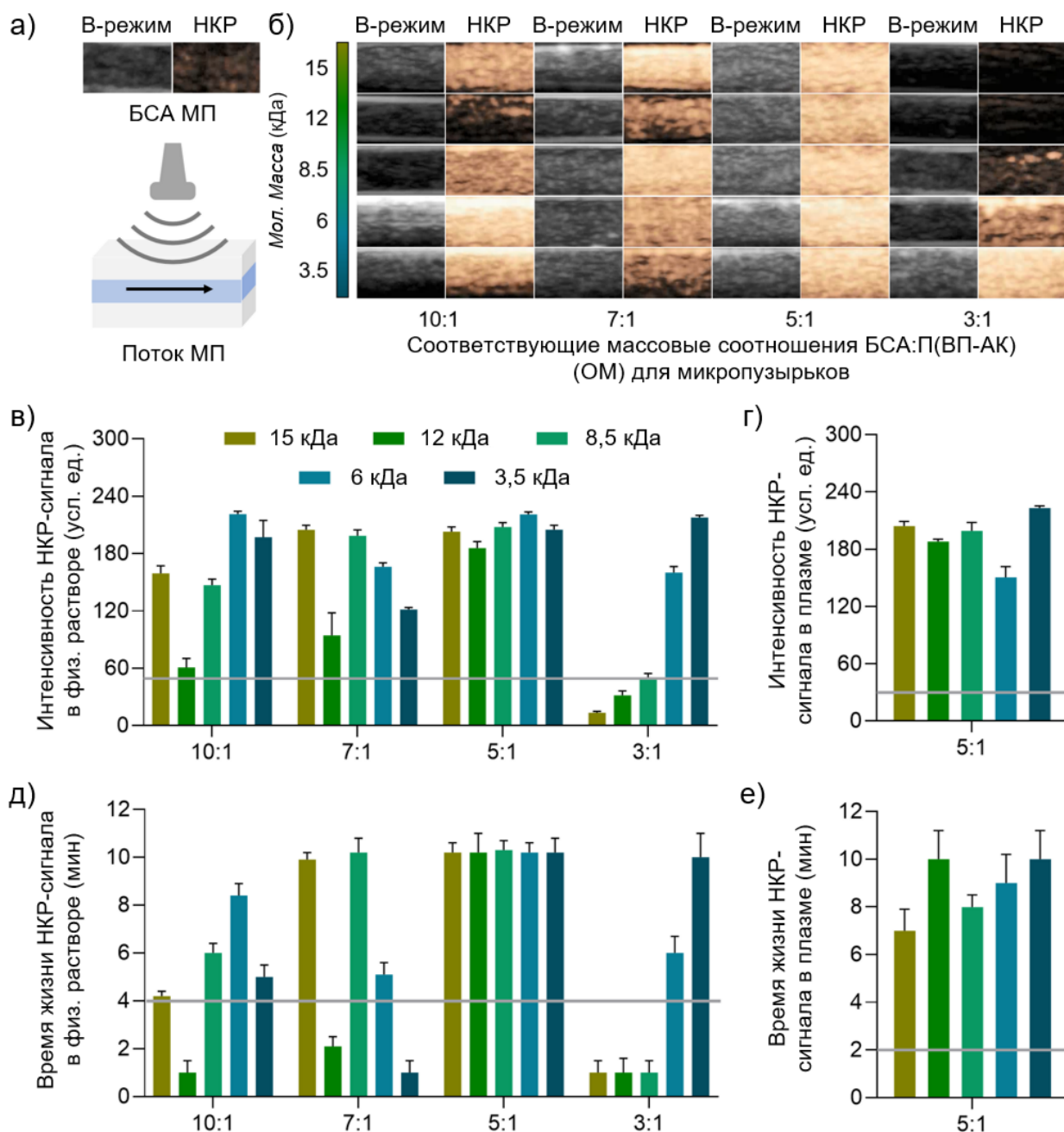


Рисунок 3.35. Акустический отклик микропузырьков БСА@П(ВП-АК) (ОМ) в модели сосуда на основе желатинового фантома. а) Схема экспериментальной установки и соответствующие ультразвуковые изображения БСА МП в В-режиме и нелинейном контрастном режиме (НКР). б) Репрезентативные изображения в указанных режимах для микропузырьков БСА@П(ВП-АК) при различных массовых соотношениях БСА:П(ВП-АК) и молекулярной массе сополимера. в) Средние значения интенсивности сигнала в НКР (усл. ед.) для соответствующих образцов в физиологическом растворе. г) Средние значения интенсивности сигнала в НКР для образцов с

массовым соотношением 5:1 в плазме крови. д) Длительность сигнала в НКР (мин) в физиологическом растворе. е) Длительность сигнала в НКР для образцов с массовым соотношением 5:1 в плазме крови. Серые линии соответствуют значениям для БСА МП. Концентрация всех образцов составляла 1×10^8 МП/мл.

Согласно представленным данным (рис. 3.35), микропузырьки на основе чистого БСА характеризовались умеренной интенсивностью сигнала в НКР (рис. 2.35а), тогда как системы БСА@П(ВП-АК) с ОМ-концевой группой демонстрировали значительно более выраженный нелинейный акустический отклик во всём диапазоне исследованных составов (рис. 3.35б).

Анализ зависимости интенсивности сигнала от состава показал, что для всей серии сополимеров с молекулярной массой 3,5–15 кДа максимальный нелинейный акустический отклик достигался при массовом соотношении БСА:П(ВП-АК) = 5:1. Количественные данные (рис. 3.35в) свидетельствуют, что при указанном составе интенсивность сигнала в НКР примерно в 4 раза превышала значения для БСА МП.

Полученные результаты согласуются с данными структурного анализа (раздел 3.3), согласно которым при массовом соотношении 5:1 формировались оптимально организованные белково-композитные комплексы, обеспечивающие эффективную упаковку компонентов на границе раздела газ–жидкость. Таким образом, оптимальная область составов, ранее установленная по результатам анализа структуры комплексов, концентрации и размерных характеристик микропузырьков (раз. 3.4), полностью подтверждается и при оценке их акустических свойств.

Дополнительно установлено, что образцы, полученные при массовом соотношении 5:1, характеризовались увеличением длительности сигнала в НКР до 10 минут, тогда как для БСА МП данный показатель составлял около 4 минут (рис. 3.35д). Это свидетельствует о повышенной устойчивости межфазной оболочки и способности микропузырьков длительно сохранять нелинейный акустический отклик.

Для оценки поведения микропузырьков в условиях, приближенных к физиологическим, аналогичные измерения были выполнены в плазме крови. Показано, что микропузырьки БСА@П(ВП-АК) сохраняли высокий уровень нелинейного акустического отклика, обеспечивая увеличение интенсивности сигнала в НКР до шести раз и длительности сигнала до 10 минут по сравнению с БСА МП (рис. 3.35г, е).

Полученные данные подтверждают, что состав межфазной оболочки является определяющим фактором акустической эффективности микропузырьков. Введение сополимера П(ВП-АК) обеспечивает формирование оболочки с улучшенными механическими характеристиками, что сопровождается усилением нелинейного акустического отклика и увеличением длительности сигнала в НКР. Наиболее эффективным оказалось массовое соотношение БСА:П(ВП-АК) = 5:1.

Несмотря на близкие значения акустических характеристик для сополимеров различной молекулярной массы при данном соотношении компонентов, совокупный анализ результатов, включающий концентрацию микропузырьков, их размерные характеристики, коллоидную стабильность и акустические свойства (раздел 3.4), позволил выделить систему на основе сополимера П(ВП-АК) с ОМ-концевой группой и молекулярной массой 8,5 кДа как наиболее оптимальную. Данный образец сочетал высокий выход микропузырьков, оптимальное распределение по размерам и выраженный нелинейный акустический отклик при высокой стабильности сигнала как в физиологическом растворе, так и в плазме крови.

Для дополнительной оценки возможностей разработанных микропузырьков в условиях, приближенных к одному из перспективных клинических применений контраст-усиленного ультразвукового исследования, использовали разработанный гинекологический ультразвуковой фантом, воспроизводящий анатомию полости матки и маточных труб. Фантом изготовлен из тканеподобных материалов с акустическими характеристиками, близкими к параметрам мягких тканей

человека, и предназначен для моделирования процедуры эхогистеросальпингоскопии (ЭхоГСС).

В качестве контрастного агента использовали выбранный по результатам проведённого исследования оптимальный образец БСА@П(ВП-АК) МП (ОМ, $M_n = 8,5$ кДа, массовое соотношение 5:1). Суспензию микропузырьков с концентрацией 1×10^8 МП/мл вводили в систему фантома с помощью перистальтического насоса при постоянной скорости потока 2 мл/мин, после чего проводили ультразвуковую визуализацию в В-режиме и НКР.

Как показано на рисунке 2.36, микропузырьки обеспечивали отчётливую визуализацию внутренних полостей фантома, включая полость матки и просвет маточной трубы.

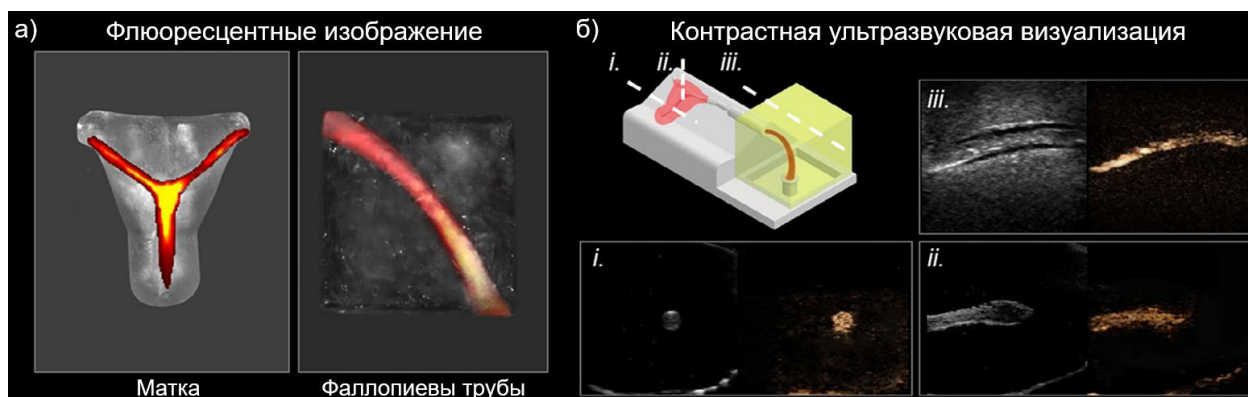


Рисунок 3.36. Визуализация микропузырьков БСА@П(ВП-АК) МП (ОМ, $M_n = 8,5$ кДа, массовое соотношение 5:1) в гинекологическом ультразвуковом фантоме. а) Флуоресцентные изображения полости матки и маточной трубы после введения суспензии микропузырьков. б) Контрастная ультразвуковая визуализация фантома: схема расположения плоскостей сканирования и соответствующие ультразвуковые изображения. Изображения (i–iii) демонстрируют визуализацию различных участков фантома после введения микропузырьков. Левая часть каждой пары изображений соответствует В-режиму, правая – нелинейному контрастному режиму (НКР), обеспечивающему регистрацию нелинейного акустического отклика

микропузырьков. Белыми пунктирными линиями на схеме обозначены плоскости сканирования, соответствующие изображениям (i–iii).

В НКР регистрировался интенсивный акустический сигнал, локализованный исключительно внутри каналов фантома, тогда как окружающий тканеподобный материал практически не создавал акустического отклика. Дополнительно флуоресцентная визуализация подтвердила сохранение микропузырьков внутри внутренних полостей без их проникновения в окружающий материал фантома.

Полученные результаты показывают, что разработанные белково-композитные микропузырьки сохраняют выраженные контрастные свойства не только в упрощённой модели сосуда, но и в анатомически сложной системе, воспроизводящей условия проведения ЭхоГСС. Это подтверждает перспективность выбранного состава в качестве контрастного агента для ультразвуковой визуализации маточных труб и других задач контраст-усиленной ультразвуковой диагностики.

В результате, система БСА@П(ВП-АК) МП на основе сополимера с ОМ-концевой группой ($M_n = 8,5$ кДа) при массовом соотношении БСА:П(ВП-АК) = 5:1 была выбрана в качестве оптимального образца для дальнейших исследований *in vivo*, включая оценку биосовместимости и эффективности ультразвукового контрастирования.

3.6.2. Сравнение акустических характеристик микропузырьков с макромолекулярными и низкомолекулярными добавками

Для сопоставления влияния природы модифицирующих компонентов на свойства микропузырьков проведено сравнительное исследование систем БСА МП, БСА@П(ВП-АК) МП и БСА@ПАм МП. Анализ включал оценку морфологических, коллоидных и акустических характеристик полученных образцов.

Как видно из рисунка 3.37, все исследованные микропузырьки имели сферическую форму и гладкую поверхность, что подтверждается результатами оптической и электронной микроскопии (рис. 3.37а, б).

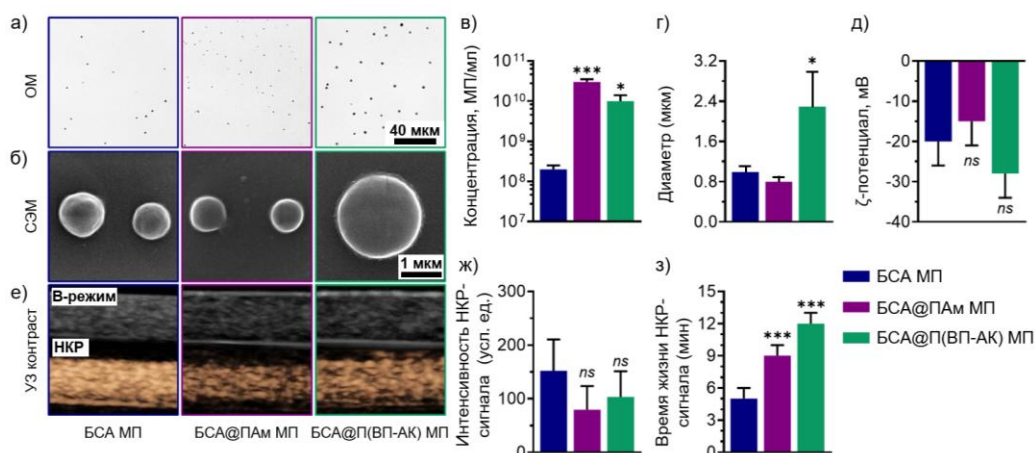


Рисунок 3.37. Физико-химическая, морфологическая и акустическая характеристика микропузырьков. а–д) Физико-химическая и морфологическая характеристика синтезированных микропузырьков: а) представительные оптические микрофотографии, б) изображения сканирующей электронной микроскопии, в) концентрация микропузырьков, г) средний диаметр, д) ζ-потенциал. е–з) Акустическая характеристика *in vitro*: е) ультразвуковые изображения в В-режиме и нелинейном контрастном режиме (НКР), ж) интенсивность сигнала в НКР, з) длительность сигнала в НКР в физиологическом растворе.

Введение как низкомолекулярной (ПАм), так и макромолекулярной (П(ВП-АК)) добавки сопровождалось существенным увеличением концентрации микропузырьков по сравнению с БСА МП (рис. 2.37в). Концентрация БСА@ПАм МП достигала около 2×10^{10} МП/мл, БСА@П(ВП-АК) МП – около 1×10^{10} МП/мл, тогда как для БСА МП составляла около 1×10^8 МП/мл.

При этом влияние добавок на размер микропузырьков существенно различалось (рис. 3.37г). Для БСА@ПАм МП средний диаметр практически не изменялся ($0,8 \pm 0,2$ мкм), тогда как для БСА@П(ВП-АК) МП увеличивался до $2,3 \pm 0,7$ мкм. Значения ζ-потенциала всех исследованных систем

оставались отрицательными и статистически значимо не различались (рис. 3.37д).

Акустические характеристики сравнивали при одинаковом газовом содержании образцов. Все системы формировали выраженный сигнал как в В-режиме, так и в нелинейном контрастном режиме (НКР) (рис. 3.37е). При этом интенсивность сигнала в НКР для БСА@ПАм МП и БСА@П(ВП-АК) МП была несколько ниже, чем для БСА МП (рис. 3.37ж), что обусловлено различной численной концентрацией микропузырьков при одинаковом газовом объёме. Для более крупных БСА@П(ВП-АК) МП число частиц в единице объёма меньше, поэтому снижение суммарного сигнала не отражает ухудшения их индивидуальных акустических свойств. Это подтверждается результатами раздела 3.6.1, где при одинаковой концентрации (1×10^8 МП/мл) микропузырьки БСА@П(ВП-АК) МП демонстрировали более высокий нелинейный акустический отклик по сравнению с БСА МП.

Использование модифицирующих добавок также сопровождалось увеличением длительности сигнала в НКР (рис. 3.37з). Наиболее выраженный эффект наблюдался для БСА@П(ВП-АК) МП, для которых длительность сигнала достигала около 10 минут, что более чем в два раза превышало соответствующее значение для БСА МП.

Таким образом, обе модифицирующие добавки повышают эффективность микропузырьков, однако реализуют её различными механизмами. ПАм обеспечивает преимущественно увеличение концентрации микропузырьков без существенного изменения их размеров, тогда как П(ВП-АК) способствует формированию более устойчивой межфазной оболочки, обеспечивающей длительное сохранение нелинейного акустического отклика. Это подтверждает, что архитектура белково-композитной оболочки является одним из ключевых факторов, определяющих функциональные свойства микропузырьков.

3.6.3. Эхоконтрастные свойства микропузырьков при эхокардиографии *in vivo*

Для оценки эхоконтрастных свойств разработанных белково-композитных микропузырьков проведено *in vivo* ультразвуковое исследование сердца крыс с регистрацией изображений в В-режиме и НКР (рис. 3.38а, г).

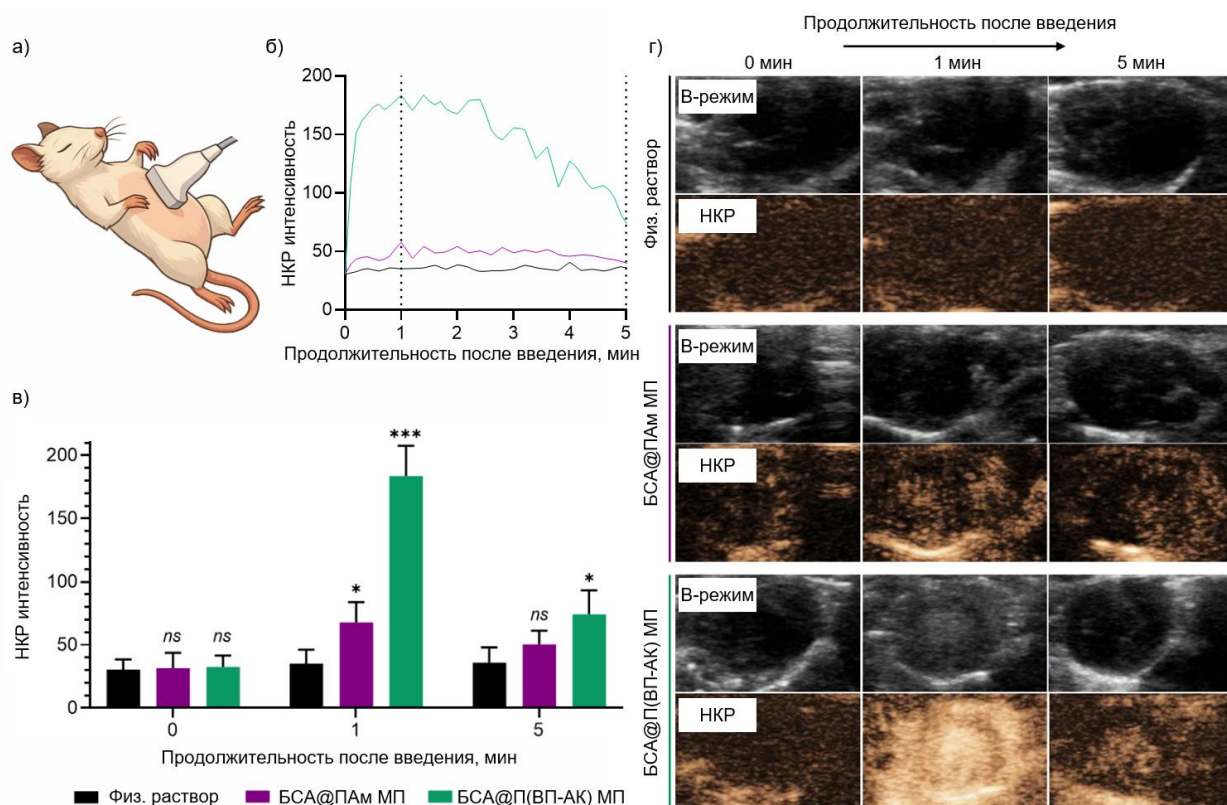


Рисунок 3.38. *in vivo* ультразвуковая визуализация сердца крыс. а) Схема проведения эксперимента по внутривенному введению исследуемых систем с последующей ультразвуковой регистрацией сигнала. б) Изменение интенсивности сигнала в нелинейном контрастном режиме во времени для исследуемых систем. в) Средние значения интенсивности сигнала в нелинейном контрастном режиме в различные моменты времени после введения. г) Представительные ультразвуковые изображения (В-режим и НКР) через 0, 1 и 5 минут после введения физиологического раствора, БСА@ПАм МП и БСА@П(ВП-АК) МП.

Микропузырьки на основе чистого БСА в данном исследовании не использовали вследствие их низкой акустической стабильности,

установленной *in vitro* (раздел 3.6.1). В качестве отрицательного контроля применяли физиологический раствор, не обладающий эхоконтрастными свойствами.

Как видно из рисунка 3.38, внутривенное введение БСА@ПАм МП и БСА@П(ВП-АК) МП сопровождалось выраженным усилением сигнала в НКР по сравнению с контрольной группой. При этом микропузырьки БСА@П(ВП-АК) МП обеспечивали более интенсивный и продолжительный акустический отклик на протяжении всего периода наблюдения, что подтверждается как количественным анализом (рис. 3.38б, в), так и визуальной оценкой ультразвуковых изображений (рис. 3.38г).

Обе системы вводили в сопоставимых концентрациях (около 10^9 МП), соответствующих диапазону, используемому при проведении аналогичных исследований. Более высокая эхоконтрастность БСА@П(ВП-АК) МП, вероятно, обусловлена их большим средним диаметром и более высокой механической стабильностью оболочки, что обеспечивает эффективное рассеяние ультразвука при рабочей частоте 8 МГц. Напротив, субмикронные БСА@ПАм МП характеризуются менее выраженным нелинейным откликом в данном диапазоне частот.

Анализ временной зависимости интенсивности сигнала (рис. 3.38в) показал, что непосредственно после введения (0 мин) статистически значимых различий между исследуемыми группами не наблюдалось, что связано с распределением микропузырьков в сосудистом русле. Через 1 минуту после введения интенсивность сигнала для БСА@П(ВП-АК) МП превышала контрольную группу в 5,2 раза и более чем в 2 раза превосходила систему БСА@ПАм МП. Через 5 минут после введения микропузырьки БСА@П(ВП-АК) МП сохраняли двукратное преимущество по интенсивности сигнала по сравнению с БСА@ПАм МП, тогда как контрастный эффект последней системы существенно снижался.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что использование амфифильного сополимера П(ВП-АК) позволяет существенно повысить

эффективность ультразвукового контрастирования *in vivo*, обеспечивая не только более высокую интенсивность сигнала, но и его длительное сохранение. В совокупности с ранее установленной гемосовместимостью и минимальным влиянием на реологические свойства крови это позволяет рассматривать БСА@П(ВП-АК) МП как наиболее перспективную систему для дальнейшего применения в качестве ультразвукового контрастного агента.

3.7. Биосовместимость белково-композитных микропузырьков *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*

3.7.1. Влияние микропузырьков на реологические свойства крови *ex vivo*

После внутривенного введения микропузырьки циркулируют в кровотоке и взаимодействуют с форменными элементами крови, прежде всего с эритроцитами, которые в значительной степени определяют её реологические свойства. Такие взаимодействия могут влиять на деформируемость и агрегацию эритроцитов, изменяя микроциркуляцию и гемодинамику [250]. В связи с этим оценка микрореологических характеристик крови является важным этапом исследования биосовместимости ультразвуковых контрастных агентов.

Реологические свойства крови определяются способностью эритроцитов деформироваться при прохождении через сосуды малого диаметра и образовывать обратимые агрегаты. Нарушение этих свойств сопровождается увеличением сопротивления кровотоку и ухудшением тканевой перфузии.

Для оценки деформируемости эритроцитов использовали метод лазерной эктаситометрии. В качестве количественного параметра использовали индекс деформируемости эритроцитов, характеризующий степень изменения формы клеток под действием сдвигового напряжения. Анализ проводили при 3 Па и 20 Па, что позволяло оценить соответственно

вклад механических свойств мембраны и максимальную деформируемость эритроцитов в условиях интенсивного кровотока.

Агрегация эритроцитов характеризует их способность образовывать обратимые клеточные агрегаты при низких скоростях кровотока. Избыточная агрегация может приводить к ухудшению микроциркуляции и повышению вязкости крови, поэтому данный показатель широко используется при оценке гемосовместимости материалов. Для её количественной оценки применяли метод лазерной агрегометрии, основанный на регистрации кинетики повторного образования агрегатов после их предварительного разрушения. В качестве количественного параметра использовали индекс агрегации эритроцитов, отражающий долю агрегированных клеток за фиксированный промежуток времени.

Дополнительно определяли критическое сдвиговое напряжение, характеризующее прочность образующихся агрегатов. Этот параметр соответствует минимальному значению сдвигового напряжения, при котором прекращается образование агрегатов эритроцитов. Повышение критического сдвигового напряжения свидетельствует о формировании более прочных агрегатов, устойчивых к гидродинамическому воздействию, тогда как его снижение указывает на их более лёгкое разрушение.

Для оценки реологических свойств крови использовали гематологический анализатор RheoScan, принцип работы которого представлен на рисунке 3.39а. Образцы цельной крови здоровых доноров модифицировали путём замещения одной десятой объёма физиологическим раствором, растворами БСА, белково-композитных комплексов или суспензиями очищенных микропузырьков с концентрациями 10^5 – 10^7 МП/мл. В качестве коммерческого препарата сравнения использовали липидный контрастный агент MicroMarker, разведённый до аналогичных концентраций.

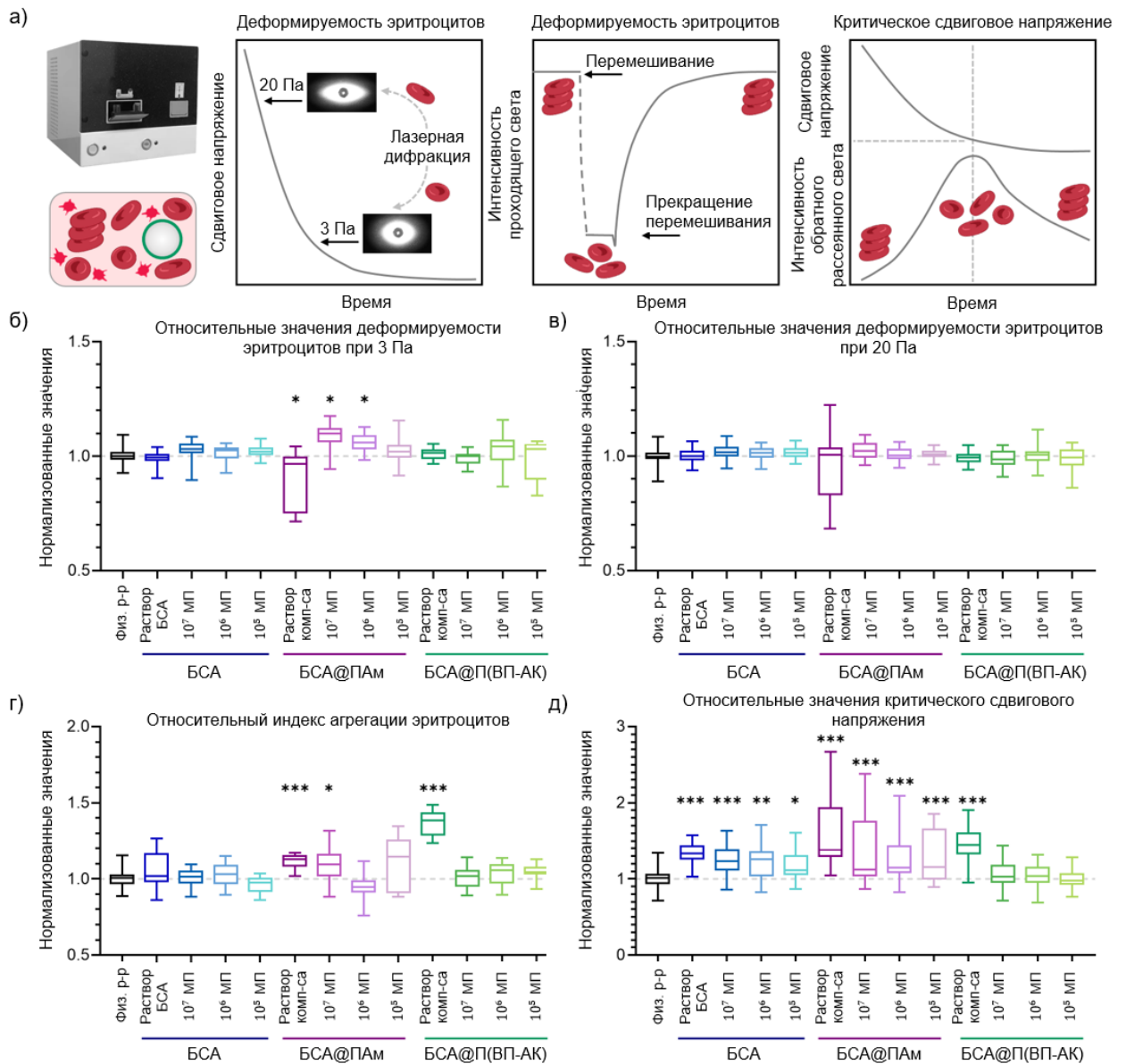


Рисунок 3.39. Оценка реологических свойств крови в присутствии микропузырьков. а) Схематическое изображение гематологического анализатора RheoScan и принципов определения деформируемости, агрегации эритроцитов и критического сдвигового напряжения. б, в) Относительные значения индекса деформируемости эритроцитов при сдвиговом напряжении 3 Па и 20 Па соответственно. г) Относительные значения индекса агрегации эритроцитов. д) Относительные значения критического сдвигового напряжения для исследуемых систем.

Для исключения междонорской вариабельности все результаты нормировали относительно контрольного образца для каждого донора.

Как видно из рисунка 3.39б, в, при сдвиговом напряжении 3 Па статистически значимое снижение деформируемости эритроцитов наблюдалось только для систем, содержащих ПАм. Для остальных образцов значения не отличались от контроля. При 20 Па различия между исследуемыми системами отсутствовали, что свидетельствует об отсутствии влияния микропузырьков на деформируемость эритроцитов в условиях интенсивного кровотока.

Анализ индекса агрегации эритроцитов (рис. 3.39г) показал, что очищенные микропузырьки БСА@П(ВП-АК) практически не изменяют агрегационные свойства крови. Незначительное увеличение агрегации наблюдалось лишь для максимальной концентрации БСА@ПАм МП и коммерческого препарата MicroMarker. Более выраженный эффект зарегистрирован для растворов белково-композитных комплексов, что, вероятно, обусловлено присутствием свободных компонентов, не вошедших в состав оболочки микропузырьков. Как было показано ранее (раздел 3.4), в оболочку включается лишь часть исходного материала, тогда как после очистки содержание свободных белково-композитных компонентов в суспензии микропузырьков становится минимальным.

Значения критического сдвигового напряжения (рис. 3.39д) для контрольной группы соответствовали литературным данным (около 200 мПа). Для растворов белково-композитных комплексов, а также для БСА МП и БСА@ПАм МП наблюдалось увеличение критического сдвигового напряжения, свидетельствующее о формировании более прочных агрегатов эритроцитов. В отличие от них, БСА@П(ВП-АК) МП не вызывали статистически значимых изменений данного показателя и были сопоставимы с коммерческим препаратом MicroMarker.

Таким образом, микропузырьки БСА@П(ВП-АК) не оказывают выраженного влияния на деформируемость, агрегацию и прочность агрегатов эритроцитов в исследованном диапазоне концентраций (10^5 – 10^7 МП/мл). Полученные результаты подтверждают их высокую гемосовместимость и

полностью согласуются с положением, выносимым на защиту, согласно которому введение белково-композитных микропузырьков не сопровождается выраженным нарушением реологических свойств крови.

3.7.2. Гематологические показатели после введения микропузырьков *in vivo* и биораспределение микропузырьков по данным флуоресцентной томографии *ex vivo*

Для комплексной оценки биосовместимости разработанных микропузырьков *in vivo* исследовали динамику основных гематологических показателей крови, а также их биораспределение в органах методом флуоресцентной томографии *ex vivo*. В качестве исследуемой системы использовали оптимальный состав БСА@П(ВП-АК) МП (ОМ, $M_n = 8,5$ кДа, массовое соотношение 5:1), выбранный по результатам предыдущих этапов работы. В качестве референсной системы применяли БСА МП, обладающие белковой оболочкой, близкой по составу к альбуминовым ультразвуковым контрастным препаратам.

Эксперименты проводили на крысах линии Wistar ($n = 3$ в каждой группе) в соответствии с требованиями биоэтики (протокол № 22/2024). Микропузырьки вводили внутривенно под общей анестезией. Образцы крови отбирали через 3 и 24 часа после введения. Для исследования биораспределения микропузырьки предварительно метили флуорофором Cy5.5 путём конъюгации с БСА с последующей отмывкой от несвязанного красителя.

Гематологическое исследование включало определение количества эритроцитов (RBC), лейкоцитов (WBC), тромбоцитов (PLT) и концентрации гемоглобина (HGB). Как видно из рисунка 3.40а–г, значения всех исследованных показателей находились в пределах физиологической нормы и статистически значимо не отличались от контрольной группы (физиологический раствор), что свидетельствует об отсутствии выраженного

системного воздействия микропузырьков на показатели периферической крови.

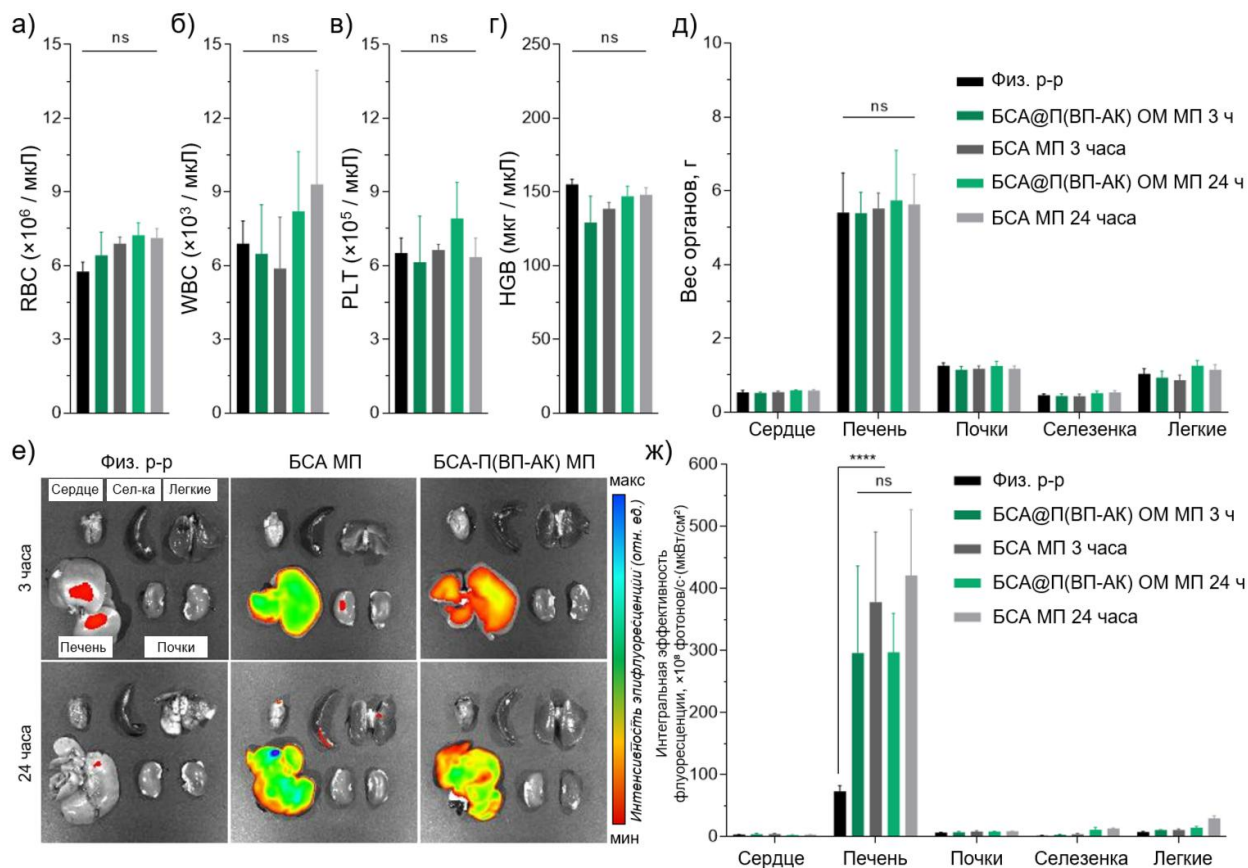


Рисунок 3.40. Биосовместимость и биораспределение микропузырьков. а–г)

Гематологические показатели крови: количество эритроцитов (RBC), лейкоцитов (WBC), тромбоцитов (PLT) и концентрация гемоглобина (HGB) в различные сроки после введения БСА МП и БСА@П(ВП-АК) МП (ОМ, $M_n = 8,5$ кДа, массовое соотношение 5:1) по сравнению с контрольной группой (физиологический раствор). д) Масса внутренних органов (сердце, печень, селезёнка, лёгкие, почки). е) Репрезентативные изображения органов с наложением флуоресцентного сигнала. ж) Количественная оценка полной световой эффективности через 3 и 24 часа после введения.

После завершения эксперимента животных подвергали эвтаназии с последующим выделением сердца, печени, селезёнки, лёгких и почек. Масса исследованных органов (рис. 3.40д) не отличалась между экспериментальными группами и соответствовала физиологическим

значениям, что также свидетельствует об отсутствии признаков острой токсичности.

Биораспределение микропузырьков исследовали методом флуоресцентной томографии *ex vivo* с использованием системы IVIS. Репрезентативные изображения органов представлены на рисунке 3.40е. Наиболее интенсивный флуоресцентный сигнал регистрировался в печени, менее выраженный – в селезёнке и лёгких, тогда как в остальных органах накопление микропузырьков было минимальным.

Количественная оценка полной световой эффективности (рис. 3.40ж) подтвердила преимущественное накопление микропузырьков в печени как через 3, так и через 24 часа после введения. Существенных различий между временными точками и исследуемыми системами не выявлено.

Наблюдаемое биораспределение соответствует современным представлениям о фармакокинетике микроразмерных частиц и обусловлено их преимущественным захватом клетками моноклеарной фагоцитарной системы, прежде всего клетками Купфера печени и макрофагами селезёнки [229]. Аналогичный характер накопления ранее был показан для различных типов ультразвуковых микропузырьков, что подтверждает физиологичность выявленного механизма их элиминации [251].

Таким образом, внутривенное введение БСА@П(ВП-АК) МП не сопровождалось изменением основных гематологических показателей (RBC, WBC, PLT и HGB), увеличением массы внутренних органов или изменением характера биораспределения по сравнению с ожидаемым для ультразвуковых контрастных агентов. Полученные результаты подтверждают высокую биосовместимость разработанных микропузырьков и показывают, что включение сополимера П(ВП-АК) в состав белково-композитной оболочки позволяет существенно повысить их концентрацию, стабильность и акустическую эффективность без ухудшения биологической безопасности системы.

3.8. Перспективы дальнейшей разработки темы

Полученные результаты показывают, что целенаправленная модификация белковой оболочки позволяет управлять процессом формирования микропузырьков, их концентрацией, устойчивостью, акустическими характеристиками и биосовместимостью. Установленные закономерности создают основу для дальнейшей разработки белково-композитных ультразвуковых контрастных агентов с заданными свойствами.

Перспективным направлением является функционализация оболочки микропузырьков диагностическими и терапевтическими компонентами, включая флуоресцентные метки, лекарственные препараты и адресные лиганды, что позволит создавать многофункциональные платформы для ультразвуковой визуализации и адресной доставки. Особый интерес представляет применение разработанных микропузырьков в сочетании с ультразвуковым воздействием для контролируемого высвобождения терапевтических соединений и временного повышения проницаемости биологических барьеров, включая гематоэнцефалический барьер. Полученные в работе данные о высокой акустической эффективности и биосовместимости делают такие исследования перспективными. Установленные различия между системами БСА@П(ВП-АК) и БСА@ПАм позволяют рассматривать их как платформы для различных биомедицинских задач. Системы на основе П(ВП-АК) представляют наибольший интерес для ультразвуковой диагностики благодаря высокой стабильности и выраженному акустическому отклику, тогда как системы на основе ПАм перспективны для разработки носителей биологически активных молекул за счёт их способности взаимодействовать с заряженными соединениями.

В целом полученные результаты формируют научную основу для дальнейшего развития белково-композитных микропузырьков как функциональных систем для ультразвуковой диагностики и терапии и создают предпосылки для их последующей трансляции в клиническую практику.

4. 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 $1655\text{--}1650\text{ см}^{-1}$, 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 эктасканирования *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 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.
7. Aldrich J. E. Basic Physics of Ultrasound Imaging // *Critical Care Medicine*. 2007. Vol. 35, Suppl. P. S131–S137. DOI: 10.1097/01.CCM.0000260624.99430.22.
8. Lawrence J. P. Physics and Instrumentation of Ultrasound // *Critical Care Medicine*. 2007. Vol. 35, № 8, Suppl. P. S314–S322. DOI: 10.1097/01.CCM.0000270241.33075.60.

9. Gore J. C., Leeman S. Ultrasonic Backscattering from Human Tissue: A Realistic Model // *Physics in Medicine & Biology*. 1977. Vol. 22, № 2. P. 317–326. DOI: 10.1088/0031-9155/22/2/011.
10. Wells P. N. T. Absorption and Dispersion of Ultrasound in Biological Tissue // *Ultrasound in Medicine & Biology*. 1975. Vol. 1, № 4. P. 369–376. DOI: 10.1016/0301-5629(75)90124-6.
11. Gu J., Jing Y. Numerical Modeling of Ultrasound Propagation in Weakly Heterogeneous Media Using a Mixed-Domain Method // *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*. 2018. Vol. 65, № 7. P. 1258–1267. DOI: 10.1109/TUFFC.2018.2828316.
12. Wells P. N. T. Ultrasound Imaging // *Physics in Medicine & Biology*. 2006. Vol. 51, № 13. P. R83–R98. DOI: 10.1088/0031-9155/51/13/R06.
13. Mitragotri S. Healing Sound: The Use of Ultrasound in Drug Delivery and Other Therapeutic Applications // *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005. Vol. 4, № 3. P. 255–260. DOI: 10.1038/nrd1662.
14. Uddin S. M. Z., Komatsu D. E., Motyka T. [et al.]. Low-Intensity Continuous Ultrasound Therapies: A Systematic Review of Current State-of-the-Art and Future Perspectives // *Journal of Clinical Medicine*. 2021. Vol. 10, № 12. Art. 2698. DOI: 10.3390/jcm10122698.
15. Charasseangpaisarn T., Wiwatwarrapan C. The Effect of Various Frequencies of Ultrasonic Cleaner in Reducing Residual Monomer in Acrylic Resin // *Ultrasonics*. 2015. Vol. 63. P. 163–167. DOI: 10.1016/j.ultras.2015.07.005.
16. Kim Y. S., Rhim H., Choi M. J. [et al.]. High-Intensity Focused Ultrasound Therapy: An Overview for Radiologists // *Korean Journal of Radiology*. 2008. Vol. 9, № 4. P. 291–302. DOI: 10.3348/kjr.2008.9.4.291.
17. Wu J., Nyborg W. L. Ultrasound, Cavitation Bubbles and Their Interaction with Cells // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008. Vol. 60, № 10. P. 1103–1116. DOI: 10.1016/j.addr.2008.03.009.

18. Harpen M. D. Basic Nonlinear Acoustics: An Introduction for Radiological Physicists // *Medical Physics*. 2006. Vol. 33, № 9. P. 3241–3247. DOI: 10.1118/1.2207128.
19. Qin S., Caskey C. F., Ferrara K. W. Ultrasound Contrast Microbubbles in Imaging and Therapy: Physical Principles and Engineering // *Physics in Medicine & Biology*. 2009. Vol. 54, № 6. P. R27–R57. DOI: 10.1088/0031-9155/54/6/R01.
20. Yusefi H., Helfield B. Ultrasound Contrast Imaging: Fundamentals and Emerging Technology // *Frontiers in Physics*. 2022. Vol. 10. Art. 791145. DOI: 10.3389/fphy.2022.791145.
21. Stride E., Coussios C. Cavitation and Its Applications in Medicine // *Nature Reviews Physics*. 2019. Vol. 1. P. 495–509. DOI: 10.1038/s42254-019-0074-y.
22. Ashokkumar M. The Characterization of Acoustic Cavitation Bubbles: An Overview // *Ultrasonics Sonochemistry*. 2011. Vol. 18, № 4. P. 864–872. DOI: 10.1016/j.ulsonch.2010.11.016.
23. Duck F. A. Nonlinear Acoustics in Diagnostic Ultrasound // *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2002. Vol. 28, № 1. P. 1–18. DOI: 10.1016/S0301-5629(01)00463-X.
24. Lewin P. A. Nonlinear Acoustics in Ultrasound Metrology and Other Selected Applications // *Physics Procedia*. 2010. Vol. 3, № 1. P. 17–23. DOI: 10.1016/j.phpro.2010.01.004.
25. de Jong N., Emmer M., van Wamel A. [et al.]. Ultrasonic Characterization of Ultrasound Contrast Agents // *Medical & Biological Engineering & Computing*. 2009. Vol. 47, № 8. P. 861–873. DOI: 10.1007/s11517-009-0497-1.
26. Tang M.-X., Mulvana H., Gauthier T. [et al.]. Quantitative Contrast-Enhanced Ultrasound Imaging: A Review of Sources of Variability // *Interface Focus*. 2011. Vol. 1, № 4. P. 520–539. DOI: 10.1098/rsfs.2011.0026.
27. Ferrara K., Pollard R., Borden M. Ultrasound Microbubble Contrast Agents: Fundamentals and Application to Gene and Drug Delivery // *Annual Review of*

- Biomedical Engineering. 2007. Vol. 9. P. 415–447. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095852.
28. Quaia E. Microbubble Ultrasound Contrast Agents: An Update // *European Radiology*. 2007. Vol. 17, № 8. P. 1995–2008. DOI: 10.1007/s00330-007-0623-0.
29. Tarighatnia A., Fouladi M. R., Nader N. D. [et al.]. Recent Trends of Contrast Agents in Ultrasound Imaging: A Review of the Classifications and Applications // *Materials Advances*. 2022. Vol. 3. P. 3726–3741. DOI: 10.1039/D1MA00969A.
30. Wegierak D., Nittayacharn P., Cooley M. B. [et al.]. Nanobubble Contrast Enhanced Ultrasound Imaging: A Review // *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2024. Vol. 16, № 6. Art. e2007. DOI: 10.1002/wnan.2007.
31. Stride E., Saffari N. Microbubble Ultrasound Contrast Agents: A Review // *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*. 2003. Vol. 217, № 6. P. 429–447. DOI: 10.1243/09544110360729072.
32. Perera R. H., Hernandez C., Zhou H. [et al.]. Ultrasound Imaging Beyond the Vasculature with New Generation Contrast Agents // *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2015. Vol. 7, № 4. P. 593–608. DOI: 10.1002/wnan.1326.
33. Paefgen V., Doleschel D., Kiessling F. Evolution of Contrast Agents for Ultrasound Imaging and Ultrasound-Mediated Drug Delivery // *Frontiers in Pharmacology*. 2015. Vol. 6. Art. 197. DOI: 10.3389/fphar.2015.00197.
34. Blomley M. J. K., Cooke J. C., Unger E. C. [et al.]. Microbubble Contrast Agents: A New Era in Ultrasound // *BMJ*. 2001. Vol. 322, № 7296. P. 1222–1225. DOI: 10.1136/bmj.322.7296.1222.
35. Appis A. W., Tracy M. J., Feinstein S. B. Update on the Safety and Efficacy of Commercial Ultrasound Contrast Agents in Cardiac Applications // *Echo Research & Practice*. 2015. Vol. 2, № 2. P. R55–R62. DOI: 10.1530/ERP-15-0018.

36. Stride E., Segers T., Lajoinie G. [et al.]. Microbubble Agents: New Directions // *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2020. Vol. 46, № 6. P. 1326–1343. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2020.01.027.
37. de Jong N., Hoff L., Skotland T. [et al.]. Absorption and Scatter of Encapsulated Gas Filled Microspheres: Theoretical Considerations and Some Measurements // *Ultrasonics*. 1992. Vol. 30, № 2. P. 95–103. DOI: 10.1016/0041-624X(92)90041-J.
38. de Jong N., Hoff L. Ultrasound Scattering Properties of Albunex Microspheres // *Ultrasonics*. 1993. Vol. 31, № 3. P. 175–181. DOI: 10.1016/0041-624X(93)90004-J.
39. Bouakaz A., de Jong N., Cachard C. Standard Properties of Ultrasound Contrast Agents // *Ultrasound in Medicine & Biology*. 1998. Vol. 24, № 3. P. 469–472. DOI: 10.1016/S0301-5629(97)00290-1.
40. Frinking P. J. A., de Jong N. Acoustic Modeling of Shell-Encapsulated Gas Bubbles // *Ultrasound in Medicine & Biology*. 1998. Vol. 24, № 4. P. 523–533. DOI: 10.1016/S0301-5629(98)00009-X.
41. Allen J. S., Kruse D. E., Dayton P. A. [et al.]. Effect of Coupled Oscillations on Microbubble Behavior // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2003. Vol. 114, № 3. P. 1678–1690. DOI: 10.1121/1.1600721.
42. Allen J. S., Roy R. A. Dynamics of Gas Bubbles in Viscoelastic Fluids. I. Linear Viscoelasticity // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2000. Vol. 107, № 6. P. 3167–3178. DOI: 10.1121/1.429344.
43. Sijl J., Overvelde M., Dollet B. [et al.]. “Compression-Only” Behavior: A Second-Order Nonlinear Response of Ultrasound Contrast Agent Microbubbles // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2011. Vol. 129, № 4. P. 1729–1739. DOI: 10.1121/1.3505116.
44. Forsberg F., Shi W. T., Goldberg B. B. Subharmonic Imaging of Contrast Agents // *Ultrasonics*. 2000. Vol. 38, № 1–8. P. 93–98. DOI: 10.1016/S0041-624X(99)00148-1.

45. Bouakaz A., Frigstad S., Ten Cate F. J. [et al.]. Super Harmonic Imaging: A New Imaging Technique for Improved Contrast Detection // *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2002. Vol. 28, № 1. P. 59–68. DOI: 10.1016/S0301-5629(01)00460-4.
46. Frinking P. J. A., Bouakaz A., Kirkhorn J. [et al.]. Ultrasound Contrast Imaging: Current and New Potential Methods // *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2000. Vol. 26, № 6. P. 965–975. DOI: 10.1016/S0301-5629(00)00229-5.
47. Daeichin V., Faez T., Renaud G. [et al.]. Effect of Self-Demodulation on the Subharmonic Response of Contrast Agent Microbubbles // *Physics in Medicine & Biology*. 2012. Vol. 57, № 12. P. 3675–3691. DOI: 10.1088/0031-9155/57/12/3675.
48. Borden M. A., Kruse D. E., Caskey C. F. [et al.]. Influence of Lipid Shell Physicochemical Properties on Ultrasound-Induced Microbubble Destruction // *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*. 2005. Vol. 52, № 11. P. 1992–2002. DOI: 10.1109/TUFFC.2005.1561668.
49. Postema M., Marmottant P., Lancée C. T. [et al.]. Ultrasound-Induced Microbubble Coalescence // *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2004. Vol. 30, № 10. P. 1337–1344. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2004.08.008.
50. Garg S., Thomas A. A., Borden M. A. The Effect of Lipid Monolayer In-Plane Rigidity on In Vivo Microbubble Circulation Persistence // *Biomaterials*. 2013. Vol. 34, № 28. P. 6862–6870. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.05.053.
51. Pu G., Borden M. A., Longo M. L. Collapse and Shedding Transitions in Binary Lipid Monolayers Coating Microbubbles // *Langmuir*. 2006. Vol. 22, № 7. P. 2993–2999. DOI: 10.1021/la0530337.
52. Kwan J. J., Borden M. A. Lipid Monolayer Collapse and Microbubble Stability // *Advances in Colloid and Interface Science*. 2012. Vol. 183–184. P. 82–99. DOI: 10.1016/j.cis.2012.08.005.

53. Greis C. Ultrasound Contrast Agents as Markers of Vascularity and Microcirculation // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2009. Vol. 43, № 1–2. P. 1–9. DOI: 10.3233/CH-2009-1216.
54. Unnikrishnan S., Klibanov A. L. Microbubbles as Ultrasound Contrast Agents for Molecular Imaging: Preparation and Application // *American Journal of Roentgenology*. 2012. Vol. 199, № 2. P. 292–299. DOI: 10.2214/AJR.12.8826.
55. Exner A. A., Kolios M. C. Bursting Microbubbles: How Nanobubble Contrast Agents Can Enable the Future of Medical Ultrasound Molecular Imaging and Image-Guided Therapy // *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2021. Vol. 54. Art. 101463. DOI: 10.1016/j.cocis.2021.101463.
56. Kumar U. S., Natarajan A., Massoud T. F. [et al.]. FN3 Linked Nanobubbles as a Targeted Contrast Agent for US Imaging of Cancer-Associated Human PD-L1 // *Journal of Controlled Release*. 2022. Vol. 346. P. 317–327. DOI: 10.1016/j.jconrel.2022.04.030.
57. Wu H., Abenojar E. C., Perera R. [et al.]. Time-Intensity-Curve Analysis and Tumor Extravasation of Nanobubble Ultrasound Contrast Agents // *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2019. Vol. 45, № 9. P. 2502–2514. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2019.05.025.
58. Loskutova K., Grishenkov D., Ghorbani M. Review on Acoustic Droplet Vaporization in Ultrasound Diagnostics and Therapeutics // *BioMed Research International*. 2019. Vol. 2019. Art. 9480193. DOI: 10.1155/2019/9480193.
59. Lin C.-Y., Pitt W. G. Acoustic Droplet Vaporization in Biology and Medicine // *BioMed Research International*. 2013. Vol. 2013. Art. 404361. DOI: 10.1155/2013/404361.
60. Sheeran P. S., Dayton P. A. Phase-Change Contrast Agents for Imaging and Therapy // *Current Pharmaceutical Design*. 2012. Vol. 18, № 15. P. 2152–2165. DOI: 10.2174/138161212800099883.
61. Peyman S. A., McLaughlan J. R., Abou-Saleh R. H. [et al.]. On-Chip Preparation of Nanoscale Contrast Agents Towards High-Resolution Ultrasound

- Imaging // Lab on a Chip. 2016. Vol. 16, № 4. P. 679–687. DOI: 10.1039/C5LC01394A.
62. Wu H., Rognin N. G., Krupka T. M. [et al.]. Acoustic Characterization and Pharmacokinetic Analyses of New Nanobubble Ultrasound Contrast Agents // Ultrasound in Medicine & Biology. 2013. Vol. 39, № 11. P. 2137–2146. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2013.05.007.
63. Krupka T. M., Solorio L., Wilson R. E. [et al.]. Formulation and Characterization of Echogenic Lipid–Pluronic Nanobubbles // Molecular Pharmaceutics. 2010. Vol. 7, № 1. P. 49–59. DOI: 10.1021/mp9001816.
64. Batchelor D. V. B., Armistead F. J., Ingram N. [et al.]. The Influence of Nanobubble Size and Stability on Ultrasound Enhanced Drug Delivery // Langmuir. 2022. Vol. 38, № 45. P. 13943–13954. DOI: 10.1021/acs.langmuir.2c02303.
65. Myers J. Z., Navarro-Becerra J. A., Borden M. A. Nanobubbles Are Non-Echogenic for Fundamental-Mode Contrast-Enhanced Ultrasound Imaging // Bioconjugate Chemistry. 2022. Vol. 33, № 6. P. 1106–1113. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.2c00155.
66. Guo R., Xu N., Liu Y. [et al.]. Functional Ultrasound-Triggered Phase-Shift Perfluorocarbon Nanodroplets for Cancer Therapy // Ultrasound in Medicine & Biology. 2021. Vol. 47, № 8. P. 2064–2079. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2021.04.003.
67. Van Namen A., Jandhyala S., Jordan T. [et al.]. Repeated Acoustic Vaporization of Perfluorohexane Nanodroplets for Contrast-Enhanced Ultrasound Imaging // IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control. 2021. Vol. 68, № 12. P. 3497–3506. DOI: 10.1109/TUFFC.2021.3093828.
68. Aliabouzar M., Kripfgans O. D., Fowlkes J. B. [et al.]. Bubble Nucleation and Dynamics in Acoustic Droplet Vaporization: A Review of Concepts, Applications, and New Directions // Zeitschrift für Medizinische Physik. 2023. Vol. 33, № 3. P. 387–406. DOI: 10.1016/j.zemedi.2023.01.004.

69. Lo A., Kripfgans O., Carson P. [et al.]. Acoustic Droplet Vaporization Threshold: Effects of Pulse Duration and Contrast Agent // *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*. 2007. Vol. 54, № 5. P. 933–946. DOI: 10.1109/TUFFC.2007.339.
70. Jandhyala S., Van Nemen A., Spatarelu C.-P. [et al.]. EGFR-Targeted Perfluorohexane Nanodroplets for Molecular Ultrasound Imaging // *Nanomaterials*. 2022. Vol. 12, № 13. Art. 2251. DOI: 10.3390/nano12132251.
71. Yoon H. Ultrasound and Photoacoustic Imaging of Laser-Activated Phase-Change Perfluorocarbon Nanodroplets // *Photonics*. 2021. Vol. 8, № 10. Art. 405. DOI: 10.3390/photonics8100405.
72. Kang S.-T., Yeh C.-K. Intracellular Acoustic Droplet Vaporization in a Single Peritoneal Macrophage for Drug Delivery Applications // *Langmuir*. 2011. Vol. 27, № 21. P. 13183–13188. DOI: 10.1021/la203212p.
73. Chen W.-T., Kang S.-T., Lin J.-L. [et al.]. Targeted Tumor Theranostics Using Folate-Conjugated and Camptothecin-Loaded Acoustic Nanodroplets in a Mouse Xenograft Model // *Biomaterials*. 2015. Vol. 53. P. 699–708. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.02.122.
74. Zhou Y. Application of Acoustic Droplet Vaporization in Ultrasound Therapy // *Journal of Therapeutic Ultrasound*. 2015. Vol. 3. Art. 20. DOI: 10.1186/s40349-015-0041-8.
75. Huang S., Hamilton A. J., Nagaraj A. [et al.]. Improving Ultrasound Reflectivity and Stability of Echogenic Liposomal Dispersions for Use as Targeted Ultrasound Contrast Agents // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001. Vol. 90, № 12. P. 1917–1926. DOI: 10.1002/jps.1142.
76. Smith D. A. B., Porter T. M., Martinez J. [et al.]. Destruction Thresholds of Echogenic Liposomes with Clinical Diagnostic Ultrasound // *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2007. Vol. 33, № 5. P. 797–809. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2006.11.017.
77. Radhakrishnan K., Haworth K. J., Huang S.-L. [et al.]. Stability of Echogenic Liposomes as a Blood Pool Ultrasound Contrast Agent in a Physiologic Flow

- Phantom // *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2012. Vol. 38, № 11. P. 1970–1981. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2012.06.012.
78. Buchanan K. D., Huang S., Kim H. [et al.]. Echogenic Liposome Compositions for Increased Retention of Ultrasound Reflectivity at Physiologic Temperature // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008. Vol. 97, № 6. P. 2242–2249. DOI: 10.1002/jps.21173.
79. Smith D. A. B., Vaidya S. S., Kopechek J. A. [et al.]. Ultrasound-Triggered Release of Recombinant Tissue-Type Plasminogen Activator from Echogenic Liposomes // *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2010. Vol. 36, № 1. P. 145–157. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2009.08.009.
80. Brüssler J., Strehlow B., Becker A. [et al.]. Correlation of Structure and Echogenicity of Nanoscaled Ultrasound Contrast Agents In Vitro // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014. Vol. 117. P. 206–215. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.02.029.
81. Lakshmanan A., Farhadi A., Nety S. P. [et al.]. Molecular Engineering of Acoustic Protein Nanostructures // *ACS Nano*. 2016. Vol. 10, № 8. P. 7314–7322. DOI: 10.1021/acsnano.6b03364.
82. Lakshmanan A., Lu G. J., Farhadi A. [et al.]. Preparation of Biogenic Gas Vesicle Nanostructures for Use as Contrast Agents for Ultrasound and MRI // *Nature Protocols*. 2017. Vol. 12, № 10. P. 2050–2080. DOI: 10.1038/nprot.2017.081.
83. Farhadi A., Ho G. H., Sawyer D. P. [et al.]. Ultrasound Imaging of Gene Expression in Mammalian Cells // *Science*. 2019. Vol. 365, № 6460. P. 1469–1475. DOI: 10.1126/science.aax4804.
84. Wang G., Song L., Hou X. [et al.]. Surface-Modified GVs as Nanosized Contrast Agents for Molecular Ultrasound Imaging of Tumor // *Biomaterials*. 2020. Vol. 236. Art. 119803. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.119803.
85. Yang F., Hu S., Zhang Y. [et al.]. A Hydrogen Peroxide-Responsive O₂ Nanogenerator for Ultrasound and Magnetic-Resonance Dual-Modality Imaging

- // Advanced Materials. 2012. Vol. 24, № 38. P. 5205–5211. DOI: 10.1002/adma.201202367.
86. Min K. H., Min H. S., Lee H. J. [et al.]. pH-Controlled Gas-Generating Mineralized Nanoparticles: A Theranostic Agent for Ultrasound Imaging and Therapy of Cancers // ACS Nano. 2015. Vol. 9, № 1. P. 134–145. DOI: 10.1021/nm506210a.
87. Yildirim A., Chattaraj R., Blum N. T. [et al.]. Stable Encapsulation of Air in Mesoporous Silica Nanoparticles: Fluorocarbon-Free Nanoscale Ultrasound Contrast Agents // Advanced Healthcare Materials. 2016. Vol. 5, № 11. P. 1290–1298. DOI: 10.1002/adhm.201600030.
88. Kang C., Cho W., Park M. [et al.]. H₂O₂-Triggered Bubble-Generating Antioxidant Polymeric Nanoparticles as Ischemia/Reperfusion-Targeted Nanotheranostics // Biomaterials. 2016. Vol. 85. P. 195–203. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.070.
89. Lee J., Min H. S., You D. G. [et al.]. Theranostic Gas-Generating Nanoparticles for Targeted Ultrasound Imaging and Treatment of Neuroblastoma // Journal of Controlled Release. 2016. Vol. 223. P. 197–206. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.12.051.
90. Kim G.-W., Kang C., Oh Y.-B. [et al.]. Ultrasonographic Imaging and Anti-Inflammatory Therapy of Muscle and Tendon Injuries Using Polymer Nanoparticles // Theranostics. 2017. Vol. 7, № 9. P. 2463–2476. DOI: 10.7150/thno.18922.
91. Go Y., Lee H., Jeong L. [et al.]. Acid-Triggered Echogenic Nanoparticles for Contrast-Enhanced Ultrasound Imaging and Therapy of Acute Liver Failure // Biomaterials. 2018. Vol. 186. P. 22–30. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.09.034.
92. Liberman A., Martinez H. P., Ta C. N. [et al.]. Hollow Silica and Silica–Boron Nano/Microparticles for Contrast-Enhanced Ultrasound to Detect Small Tumors // Biomaterials. 2012. Vol. 33, № 20. P. 5124–5129. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.03.066.

93. Kim D.-S., Song N., Lee D. [et al.]. Comparison of Ultrasound Contrast between H₂O₂-Responsive Nanoparticles and Microbubble Contrast According to Muscle Injury in Rat Models // *Diagnostics*. 2023. Vol. 13, № 21. Art. 3320. DOI: 10.3390/diagnostics13213320.
94. Frinking P., Segers T., Luan Y. [et al.]. Three Decades of Ultrasound Contrast Agents: A Review of the Past, Present and Future Improvements // *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2020. Vol. 46, № 4. P. 892–908. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2019.12.008.
95. Cosgrove D. Ultrasound Contrast Agents: An Overview // *European Journal of Radiology*. 2006. Vol. 60, № 3. P. 324–330. DOI: 10.1016/j.ejrad.2006.06.022.
96. Meairs S., Alonso A. Ultrasound, Microbubbles and the Blood–Brain Barrier // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2007. Vol. 93, № 1–3. P. 354–362. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.019.
97. Vince O., Peeters S., Johanssen V. A. [et al.]. Microbubbles Containing Lysolipid Enhance Ultrasound-Mediated Blood–Brain Barrier Breakdown In Vivo // *Advanced Healthcare Materials*. 2021. Vol. 10. Art. 2001343. DOI: 10.1002/adhm.202001343.
98. Yan Y., Chen Y., Liu Z. [et al.]. Brain Delivery of Curcumin Through Low-Intensity Ultrasound-Induced Blood–Brain Barrier Opening via Lipid–PLGA Nanobubbles // *International Journal of Nanomedicine*. 2021. Vol. 16. P. 7433–7447. DOI: 10.2147/IJN.S327737.
99. Burgess M. T., Apostolakis I., Konofagou E. E. Power Cavitation-Guided Blood–Brain Barrier Opening with Focused Ultrasound and Microbubbles // *Physics in Medicine & Biology*. 2018. Vol. 63, № 6. Art. 065009. DOI: 10.1088/1361-6560/aab05c.
100. Deprez J., Lajoinie G., Engelen Y. [et al.]. Opening Doors with Ultrasound and Microbubbles: Beating Biological Barriers to Promote Drug Delivery // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021. Vol. 172. P. 9–36. DOI: 10.1016/j.addr.2021.02.015.

101. Epstein P. S., Plesset M. S. On the Stability of Gas Bubbles in Liquid–Gas Solutions // *The Journal of Chemical Physics*. 1950. Vol. 18, № 11. P. 1505–1509. DOI: 10.1063/1.1747520.
102. Plesset M. S., Prosperetti A. Bubble Dynamics and Cavitation // *Annual Review of Fluid Mechanics*. 1977. Vol. 9. P. 145–185. DOI: 10.1146/annurev.fl.09.010177.001045.
103. Upadhyay A., Dalvi S. V. Microbubble Formulations: Synthesis, Stability, Modeling and Biomedical Applications // *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2019. Vol. 45, № 2. P. 301–343. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2018.09.022.
104. Versluis M., Stride E., Lajoinie G. [et al.]. Ultrasound Contrast Agent Modeling: A Review // *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2020. Vol. 46, № 9. P. 2117–2144. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2020.04.014.
105. Rayleigh L. On the Pressure Developed in a Liquid during the Collapse of a Spherical Cavity // *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*. 1917. Vol. 34, № 200. P. 94–98. DOI: 10.1080/14786440808635681.
106. Prosperetti A. Bubbles // *Physics of Fluids*. 2004. Vol. 16, № 6. P. 1852–1865. DOI: 10.1063/1.1695308.
107. Prosperetti A. Bubble Phenomena in Sound Fields: Part One // *Ultrasonics*. 1984. Vol. 22, № 2. P. 69–77. DOI: 10.1016/0041-624X(84)90042-5.
108. Zhong X., Ardekani A. M. A Model for Bubble Dynamics in a Protein Solution // *Journal of Fluid Mechanics*. 2022. Vol. 935. Art. A27. DOI: 10.1017/jfm.2022.20.
109. Rudakovskaya P. G., Barmin R. A., Kuzmin P. S. [et al.]. Microbubbles Stabilized by Protein Shell: From Pioneering Ultrasound Contrast Agents to Advanced Theranostic Systems // *Pharmaceutics*. 2022. Vol. 14, № 6. Art. 1236. DOI: 10.3390/pharmaceutics14061236.

110. Sirsi S. R., Borden M. A. Microbubble Compositions, Properties and Biomedical Applications // *Bubble Science, Engineering & Technology*. 2009. Vol. 1, № 1–2. P. 3–17. DOI: 10.1179/175889709X446507.
111. Tse C., Zohdy M. J., Ye J. Y. [et al.]. Acoustic Detection of Controlled Laser-Induced Microbubble Creation in Gelatin // *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*. 2005. Vol. 52, № 11. P. 1962–1969. DOI: 10.1109/TUFFC.2005.1561665.
112. Langeveld S. A. G., Beekers I., Collado-Lara G. [et al.]. The Impact of Lipid Handling and Phase Distribution on the Acoustic Behavior of Microbubbles // *Pharmaceutics*. 2021. Vol. 13, № 1. Art. 119. DOI: 10.3390/pharmaceutics13010119.
113. Toumia Y., Cerroni B., Domenici F. [et al.]. Phase Change Ultrasound Contrast Agents with a Photopolymerized Diacetylene Shell // *Langmuir*. 2019. Vol. 35, № 31. P. 10116–10127. DOI: 10.1021/acs.langmuir.9b01160.
114. Khan A. H., Dalvi S. V. Kinetics of Albumin Microbubble Dissolution in Aqueous Media // *Soft Matter*. 2020. Vol. 16, № 8. P. 2149–2163. DOI: 10.1039/C9SM01516G.
115. Church C. C. The Effects of an Elastic Solid Surface Layer on the Radial Pulsations of Gas Bubbles // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 1995. Vol. 97, № 3. P. 1510–1521. DOI: 10.1121/1.412091.
116. Hoff L., Sontum P. C., Hovem J. M. Oscillations of Polymeric Microbubbles: Effect of the Encapsulating Shell // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2000. Vol. 107, № 4. P. 2272–2280. DOI: 10.1121/1.428557.
117. Doinikov A. A., Bouakaz A. Review of Shell Models for Contrast Agent Microbubbles // *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*. 2011. Vol. 58, № 5. P. 981–993. DOI: 10.1109/TUFFC.2011.1899.
118. Marmottant P., van der Meer S., Emmer M. [et al.]. A Model for Large Amplitude Oscillations of Coated Bubbles Accounting for Buckling and Rupture

// The Journal of the Acoustical Society of America. 2005. Vol. 118, № 6. P. 3499–3505. DOI: 10.1121/1.2109427.

119. Kikuchi Y., Kanagawa T., Ayukai T. Physico-Mathematical Model for Multiple Ultrasound-Contrast-Agent Microbubbles Encapsulated by a Visco-Elastic Shell: Effect of Shell Compressibility on Ultrasound Attenuation // Chemical Engineering Science. 2023. Vol. 269. Art. 117541. DOI: 10.1016/j.ces.2022.117541.

120. Overvelde M., Garbin V., Sijl J. [et al.]. Nonlinear Shell Behavior of Phospholipid-Coated Microbubbles // Ultrasound in Medicine & Biology. 2010. Vol. 36, № 12. P. 2080–2092. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2010.08.015.

121. Chlon C., Guédon C., Verhaagen B. [et al.]. Effect of Molecular Weight, Crystallinity, and Hydrophobicity on the Acoustic Activation of Polymer-Shelled Ultrasound Contrast Agents // Biomacromolecules. 2009. Vol. 10, № 5. P. 1025–1031. DOI: 10.1021/bm801243u.

122. Doinikov A. A., Bouakaz A. Modeling of the Dynamics of Microbubble Contrast Agents in Ultrasonic Medicine: Survey // Journal of Applied Mechanics and Technical Physics. 2013. Vol. 54, № 6. P. 867–876. DOI: 10.1134/S0021894413060011.

123. Keller J. B., Miksis M. Bubble Oscillations of Large Amplitude // The Journal of the Acoustical Society of America. 1980. Vol. 68, № 2. P. 628–633. DOI: 10.1121/1.384720.

124. Doinikov A. A., Dayton P. A. Spatio-Temporal Dynamics of an Encapsulated Gas Bubble in an Ultrasound Field // The Journal of the Acoustical Society of America. 2006. Vol. 120, № 2. P. 661–669. DOI: 10.1121/1.221522.

125. Doinikov A. A., Zhao S., Dayton P. A. Modeling of the Acoustic Response from Contrast Agent Microbubbles Near a Rigid Wall // Ultrasonics. 2009. Vol. 49, № 2. P. 195–201. DOI: 10.1016/j.ultras.2008.07.017.

126. Sarkar K., Shi W. T., Chatterjee D. [et al.]. Characterization of Ultrasound Contrast Microbubbles Using In Vitro Experiments and Viscous and

- Viscoelastic Interface Models for Encapsulation // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2005. Vol. 118, № 1. P. 539–550. DOI: 10.1121/1.1923367.
127. Cattaneo M., Supponen O. Shell Viscosity Estimation of Lipid-Coated Microbubbles // *Soft Matter*. 2023. Vol. 19, № 31. P. 5925–5941. DOI: 10.1039/D3SM00871A.
128. Doinikov A. A., Dayton P. A. Maxwell Rheological Model for Lipid-Shelled Ultrasound Microbubble Contrast Agents // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2007. Vol. 121, № 6. P. 3331–3340. DOI: 10.1121/1.2722233.
129. Alsadiq H., Alhay Z. Mechanical Properties of Medical Microbubbles and Echogenic Liposomes—A Review // *Micromachines*. 2025. Vol. 16, № 5. Art. 588. DOI: 10.3390/mi16050588.
130. Chabouh G., Dollet B., Quilliet C. [et al.]. Spherical Oscillations of Encapsulated Microbubbles: Effect of Shell Compressibility and Anisotropy // *The Journal of the Acoustical Society of America*. 2021. Vol. 149, № 2. P. 1240–1257. DOI: 10.1121/10.0003500.
131. Doinikov A. A., Haac J. F., Dayton P. A. Modeling of Nonlinear Viscous Stress in Encapsulating Shells of Lipid-Coated Contrast Agent Microbubbles // *Ultrasonics*. 2009. Vol. 49, № 2. P. 269–275. DOI: 10.1016/j.ultras.2008.09.007.
132. Qin D., Zou Q., Lei S. Cavitation Dynamics and Inertial Cavitation Threshold of Lipid-Coated Microbubbles in Viscoelastic Media with Bubble–Bubble Interactions // *Micromachines*. 2021. Vol. 12, № 9. Art. 1125. DOI: 10.3390/mi12091125.
133. Li Z.-C. Enhancing Cavitation Dynamics and Its Mechanical Effects with Dual-Frequency Ultrasound // *Physics in Medicine & Biology*. 2022. Vol. 67, № 8. Art. 085017. DOI: 10.1088/1361-6560/ac6288.
134. Suslick K. S. Sonochemistry // *Science*. 1990. Vol. 247, № 4949. P. 1439–1445. DOI: 10.1126/science.247.4949.1439.

135. Grinstaff M. W., Suslick K. S. Air-Filled Proteinaceous Microbubbles: Synthesis of an Echo-Contrast Agent // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991. Vol. 88, № 17. P. 7708–7710. DOI: 10.1073/pnas.88.17.7708.
136. Cavalieri F., Ashokkumar M., Grieser F. [et al.]. Ultrasonic Synthesis of Stable, Functional Lysozyme Microbubbles // *Langmuir*. 2008. Vol. 24, № 18. P. 10078–10083. DOI: 10.1021/la801093q.
137. Ma X., Bussonnière A., Liu Q. A Facile Sonochemical Synthesis of Shell-Stabilized Reactive Microbubbles Using Surface-Thiolated Bovine Serum Albumin with the Traut's Reagent // *Ultrasonics Sonochemistry*. 2017. Vol. 36. P. 454–465. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2016.12.033.
138. Farook U., Stride E., Edirisinghe M. J. Preparation of Suspensions of Phospholipid-Coated Microbubbles by Coaxial Electrohydrodynamic Atomization // *Journal of the Royal Society Interface*. 2009. Vol. 6, № 32. P. 271–277. DOI: 10.1098/rsif.2008.0225.
139. Pulsipher K. W., Hammer D. A., Lee D. [et al.]. Engineering Theranostic Microbubbles Using Microfluidics for Ultrasound Imaging and Therapy: A Review // *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2018. Vol. 44, № 12. P. 2441–2460. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2018.07.026.
140. Seo M., Gorelikov I., Williams R. [et al.]. Microfluidic Assembly of Monodisperse, Nanoparticle-Incorporated Perfluorocarbon Microbubbles for Medical Imaging and Therapy // *Langmuir*. 2010. Vol. 26, № 17. P. 13855–13860. DOI: 10.1021/la102272d.
141. Chen J. L., Dhanaliwala A. H., Dixon A. J. [et al.]. Synthesis and Characterization of Transiently Stable Albumin-Coated Microbubbles via a Flow-Focusing Microfluidic Device // *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2014. Vol. 40, № 2. P. 400–409. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2013.09.024.
142. Khan A. H., Surwase S., Jiang X. [et al.]. Enhancing In Vitro Stability of Albumin Microbubbles Produced Using Microfluidic T-Junction Device //

- Langmuir. 2022. Vol. 38, № 6. P. 5052–5062. DOI: 10.1021/acs.langmuir.1c01516.
143. Jiang X., Zhang Y., Edirisinghe M. [et al.]. Combining Microfluidic Devices with Coarse Capillaries to Reduce the Size of Monodisperse Microbubbles // RSC Advances. 2016. Vol. 6, № 68. P. 63568–63577. DOI: 10.1039/C6RA09802A.
144. Yan W.-C., Chua Q. W., Ong X. J. [et al.]. Fabrication of Ultrasound-Responsive Microbubbles via Coaxial Electrohydrodynamic Atomization for Triggered Release of tPA // Journal of Colloid and Interface Science. 2017. Vol. 501. P. 282–293. DOI: 10.1016/j.jcis.2017.04.073.
145. Mahalingam S., Meinders M. B. J., Edirisinghe M. Formation, Stability, and Mechanical Properties of Bovine Serum Albumin Stabilized Air Bubbles Produced Using Coaxial Electrohydrodynamic Atomization // Langmuir. 2014. Vol. 30, № 23. P. 6694–6703. DOI: 10.1021/la5011715.
146. Farook U., Stride E., Edirisinghe M. J. [et al.]. Microbubbling by Co-Axial Electrohydrodynamic Atomization // Medical & Biological Engineering & Computing. 2007. Vol. 45, № 8. P. 781–789. DOI: 10.1007/s11517-007-0210-1.
147. Yan W.-C., Ong X. J., Pun K. T. [et al.]. Preparation of tPA-Loaded Microbubbles as Potential Theranostic Agents: A Novel One-Step Method via Coaxial Electrohydrodynamic Atomization Technique // Chemical Engineering Journal. 2017. Vol. 307. P. 168–180. DOI: 10.1016/j.cej.2016.08.081.
148. Mahalingam S., Raimi-Abraham B. T., Craig D. Q. M. [et al.]. Formation of Protein and Protein–Gold Nanoparticle Stabilized Microbubbles by Pressurized Gyration // Langmuir. 2015. Vol. 31, № 2. P. 659–666. DOI: 10.1021/la502181g.
149. Kukizaki M., Goto M. Spontaneous Formation Behavior of Uniform-Sized Microbubbles from Shirasu Porous Glass (SPG) Membranes in the Absence of Water-Phase Flow // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2007. Vol. 296, № 1–3. P. 174–181. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2006.09.042.

150. Vong F., Son Y., Bhuiyan S. [et al.]. A Comparison of the Physical Properties of Ultrasonically Synthesized Lysozyme- and BSA-Shelled Microbubbles // *Ultrasonics Sonochemistry*. 2014. Vol. 21, № 1. P. 23–28. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2013.05.004.
151. Ramos R., Bernard J., Ganachaud F. [et al.]. Protein-Based Encapsulation Strategies: Toward Micro- and Nanoscale Carriers with Increased Functionality // *Small Science*. 2022. Vol. 2, № 3. Art. 2100095. DOI: 10.1002/smsc.202100095.
152. Radibratovic M., Minic S., Stanic-Vucinic D. [et al.]. Stabilization of Human Serum Albumin by the Binding of Phycocyanobilin, a Bioactive Chromophore of Blue-Green Alga *Spirulina*: Molecular Dynamics and Experimental Study // *PLOS ONE*. 2016. Vol. 11, № 12. Art. e0167973. DOI: 10.1371/journal.pone.0167973.
153. Avivi S., Gedanken A. S–S Bonds Are Not Required for the Sonochemical Formation of Proteinaceous Microspheres: The Case of Streptavidin // *Biochemical Journal*. 2002. Vol. 366, № 3. P. 705–707. DOI: 10.1042/BJ20020676.
154. Pathak R., Bhangu S. K., Martin G. J. O. [et al.]. Ultrasound-Induced Protein Restructuring and Ordered Aggregation to Form Amyloid Crystals // *European Biophysics Journal*. 2022. Vol. 51, № 4–5. P. 335–352. DOI: 10.1007/s00249-022-01601-4.
155. Arunkumar R., Drummond C. J., Greaves T. L. FTIR Spectroscopic Study of the Secondary Structure of Globular Proteins in Aqueous Protic Ionic Liquids // *Frontiers in Chemistry*. 2019. Vol. 7. Art. 74. DOI: 10.3389/fchem.2019.00074.
156. Rovers T. A. M., Sala G., van der Linden E. [et al.]. Effect of Temperature and Pressure on the Stability of Protein Microbubbles // *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2016. Vol. 8, № 1. P. 333–340. DOI: 10.1021/acsami.5b08527.

157. Richert M. E., García Rey N., Braunschweig B. Charge-Controlled Surface Properties of Native and Fluorophore-Labeled Bovine Serum Albumin at the Air–Water Interface // *The Journal of Physical Chemistry B*. 2018. Vol. 122, № 44. P. 10377–10383. DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b06481.
158. Rovers T. A. M., Sala G., van der Linden E. [et al.]. Disintegration of Protein Microbubbles in Presence of Acid and Surfactants: A Multi-Step Process // *Soft Matter*. 2015. Vol. 11, № 32. P. 6403–6411. DOI: 10.1039/C5SM01296A.
159. Upadhyay A., Dalvi S. V., Gupta G. [et al.]. Effect of PEGylation on Performance of Protein Microbubbles and Its Comparison with Lipid Microbubbles // *Materials Science and Engineering: C*. 2017. Vol. 71. P. 425–430. DOI: 10.1016/j.msec.2016.10.021.
160. Caracciolo G., Farokhzad O. C., Mahmoudi M. Biological Identity of Nanoparticles In Vivo: Clinical Implications of the Protein Corona // *Trends in Biotechnology*. 2017. Vol. 35, № 3. P. 257–264. DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.08.011.
161. Mishra R. K., Ahmad A., Vyawahare A. [et al.]. Biological Effects of Formation of Protein Corona onto Nanoparticles // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021. Vol. 175. P. 1–18. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.01.152.
162. Barmin R., Moosavifar M., Zhang R. Hybrid Ultrasound and Photoacoustic Contrast Agent Designs Combining Metal Phthalocyanines and PBCA Microbubbles // *Journal of Materials Chemistry B*. 2024. Vol. 12, № 10. P. 2511–2522. DOI: 10.1039/D3TB02950F.
163. Cedervall T., Lynch I., Lindman S. [et al.]. Understanding the Nanoparticle–Protein Corona Using Methods to Quantify Exchange Rates and Affinities of Proteins for Nanoparticles // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007. Vol. 104, № 7. P. 2050–2055. DOI: 10.1073/pnas.0608582104.
164. Monopoli M. P., Åberg C., Salvati A. [et al.]. Biomolecular Coronas Provide the Biological Identity of Nanosized Materials // *Nature*

- Nanotechnology. 2012. Vol. 7, № 12. P. 779–786. DOI: 10.1038/nano.2012.207.
165. Chen D., Ganesh S., Wang W. [et al.]. Plasma Protein Adsorption and Biological Identity of Systemically Administered Nanoparticles // Nanomedicine. 2017. Vol. 12, № 17. P. 2113–2135. DOI: 10.2217/nmm-2017-0178.
166. del Pino P., Pelaz B., Zhang Q. [et al.]. Protein Corona Formation around Nanoparticles: From the Past to the Future // Materials Horizons. 2014. Vol. 1, № 3. P. 301–313. DOI: 10.1039/C3MH00106G.
167. Kamaly N., Farokhzad O. C., Corbo C. Nanoparticle Protein Corona Evolution: From Biological Impact to Biomarker Discovery // Nanoscale. 2022. Vol. 14, № 5. P. 1606–1620. DOI: 10.1039/D1NR06580G.
168. Hajipour M. J., Safavi-Sohi R. An Overview of Nanoparticle Protein Corona Literature // Small. 2023. Vol. 19, № 36. Art. e2301838. DOI: 10.1002/smll.202301838.
169. Pareek V., Bhargava A., Bhanot V. [et al.]. Formation and Characterization of Protein Corona Around Nanoparticles: A Review // Journal of Nanoscience and Nanotechnology. 2018. Vol. 18, № 10. P. 6653–6670. DOI: 10.1166/jnn.2018.15766.
170. Sun Y., Zhou Y., Rehman M. Protein Corona of Nanoparticles: Isolation and Analysis // Chem & Bio Engineering. 2024. Vol. 1, № 9. DOI: 10.1021/cbe.4c00105.
171. Kuperkar K., Patel D., Atanase L. I. [et al.]. Amphiphilic Block Copolymers: Their Structures, and Self-Assembly to Polymeric Micelles and Polymersomes as Drug Delivery Vehicles // Polymers. 2022. Vol. 14, № 21. Art. 4702. DOI: 10.3390/polym14214702.
172. Lombardo D., Kiselev M. A., Magazù S. [et al.]. Amphiphiles Self-Assembly: Basic Concepts and Future Perspectives of Supramolecular Approaches // Advances in Condensed Matter Physics. 2015. Vol. 2015. Art. 151683. DOI: 10.1155/2015/151683.

173. Su Z., Zhang R., Yan X.-Y. [et al.]. The Role of Architectural Engineering in Macromolecular Self-Assemblies via Non-Covalent Interactions: A Molecular LEGO Approach // *Progress in Polymer Science*. 2020. Vol. 103. Art. 101230. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2020.101230.
174. Ohshio M., Ishihara K., Yusa S. Self-Association Behavior of Cell Membrane-Inspired Amphiphilic Random Copolymers in Water // *Polymers*. 2019. Vol. 11, № 2. Art. 327. DOI: 10.3390/polym11020327.
175. Maibaum L., Dinner A. R., Chandler D. Micelle Formation and the Hydrophobic Effect // *The Journal of Physical Chemistry B*. 2004. Vol. 108, № 21. P. 6778–6781. DOI: 10.1021/jp037487t.
176. López-Ríos de Castro R., Ziolek R. M., Lorenz C. D. Topology-Controlled Self-Assembly of Amphiphilic Block Copolymers // *Nanoscale*. 2023. Vol. 15, № 37. P. 15230–15237. DOI: 10.1039/D3NR01204B.
177. Kono H., Hibino M., Ida D. [et al.]. Self-Assembly of Amphiphilic Alternating Copolymers by Chain Folding in Water: From Uniform Composition and Sequence to Monodisperse Micelles // *Macromolecules*. 2023. Vol. 56, № 15. P. 6086–6098. DOI: 10.1021/acs.macromol.3c00649.
178. Achazi K., Haag R., Ballauff M. [et al.]. Understanding the Interaction of Polyelectrolyte Architectures with Proteins and Biosystems // *Angewandte Chemie International Edition*. 2021. Vol. 60, № 8. P. 3882–3904. DOI: 10.1002/anie.202006457.
179. Cooper C. L., Dubin P. L., Kayitmazer A. B. [et al.]. Polyelectrolyte–Protein Complexes // *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2005. Vol. 10, № 1–2. P. 52–78. DOI: 10.1016/j.cocis.2005.05.007.
180. Zhou J., Wan Y., Cohen Stuart M. A. [et al.]. Effects of Control Factors on Protein–Polyelectrolyte Complex Coacervation // *Biomacromolecules*. 2023. Vol. 24, № 12. P. 5759–5772. DOI: 10.1021/acs.biomac.3c00717.
181. Stevens C. A., Kaur K., Klok H.-A. Self-Assembly of Protein–Polymer Conjugates for Drug Delivery // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021. Vol. 174. P. 447–460. DOI: 10.1016/j.addr.2021.05.002.

182. Gao S., Holkar A., Srivastava S. Protein–Polyelectrolyte Complexes and Micellar Assemblies // *Polymers*. 2019. Vol. 11, № 7. Art. 1097. DOI: 10.3390/polym11071097.
183. Houvenagel S., Moine L., Picheth G. [et al.]. Comb-Like Fluorophilic–Lipophilic–Hydrophilic Polymers for Nanocapsules as Ultrasound Contrast Agents // *Biomacromolecules*. 2018. Vol. 19, № 8. P. 3244–3256. DOI: 10.1021/acs.biomac.8b00506.
184. Le S. P., Krishna J., Gupta P. [et al.]. Polymers for Disrupting Protein–Protein Interactions: Where Are We and Where Should We Be? // *Biomacromolecules*. 2024. Vol. 25, № 10. P. 6229–6249. DOI: 10.1021/acs.biomac.4c00850.
185. Cho D. H., Hahm J.-I. Protein–Polymer Interaction Characteristics Unique to Nanoscale Interfaces: A Perspective on Recent Insights // *The Journal of Physical Chemistry B*. 2021. Vol. 125, № 23. P. 6040–6057. DOI: 10.1021/acs.jpcb.1c00684.
186. Garnier S., Laschewsky A. New Amphiphilic Diblock Copolymers: Surfactant Properties and Solubilization in Their Micelles // *Langmuir*. 2006. Vol. 22, № 9. P. 4044–4053. DOI: 10.1021/la0600595.
187. Hadjiantoniou N. A., Triftaridou A. I., Kafouris D. [et al.]. Synthesis and Characterization of Amphiphilic Multiblock Copolymers: Effect of the Number of Blocks on Micellization // *Macromolecules*. 2009. Vol. 42, № 15. P. 5492–5498. DOI: 10.1021/ma900554k.
188. Bae Y. H., Huh K. M., Kim Y. [et al.]. Biodegradable Amphiphilic Multiblock Copolymers and Their Implications for Biomedical Applications // *Journal of Controlled Release*. 2000. Vol. 64, № 1–3. P. 3–13. DOI: 10.1016/S0168-3659(99)00126-1.
189. Figueroa-Ochoa E. B., Bravo-Anaya L. M., Vaca-López R. [et al.]. Structural Behavior of Amphiphilic Triblock Copolymer P104/Water System // *Polymers*. 2023. Vol. 15, № 11. Art. 2551. DOI: 10.3390/polym15112551.

190. Loiola L. M. D., Más B. A., Duek E. A. R. [et al.]. Amphiphilic Multiblock Copolymers of PLLA, PEO and PPO Blocks: Synthesis, Properties and Cell Affinity // *European Polymer Journal*. 2015. Vol. 68. P. 618–629. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2015.03.034.
191. Goswami K. G., Mete S., Chaudhury S. S. [et al.]. Self-Assembly of Amphiphilic Copolymers with Sequence-Controlled Alternating Hydrophilic–Hydrophobic Pendant Side Chains // *ACS Applied Polymer Materials*. 2020. Vol. 2, № 5. P. 2035–2045. DOI: 10.1021/acsapm.0c00204.
192. Nishimura T., Fujii S., Sakurai K. [et al.]. Manipulating the Morphology of Amphiphilic Graft-Copolymer Assemblies by Adjusting the Flexibility of the Main Chain // *Macromolecules*. 2021. Vol. 54, № 14. P. 7003–7009. DOI: 10.1021/acs.macromol.1c01030.
193. Sakamoto Y., Nishimura T. Recent Advances in the Self-Assembly of Sparsely Grafted Amphiphilic Copolymers in Aqueous Solution // *Polymer Chemistry*. 2022. Vol. 13, № 46. P. 6343–6360. DOI: 10.1039/D2PY01018F.
194. Verduzco R., Li X., Pesek S. L. [et al.]. Structure, Function, Self-Assembly, and Applications of Bottlebrush Copolymers // *Chemical Society Reviews*. 2015. Vol. 44, № 8. P. 2405–2420. DOI: 10.1039/C4CS00329B.
195. Kulikov P. P., Kuskov A. N., Goryachaya A. V. [et al.]. Synthesis, Self-Assembly and In Vitro Cellular Uptake Kinetics of Nanosized Drug Carriers Based on Aggregates of Amphiphilic Oligomers of N-Vinyl-2-pyrrolidone // *Materials*. 2021. Vol. 14, № 20. Art. 5977. DOI: 10.3390/ma14205977.
196. Kuskov A. N., Luss A. L., Gritskova I. A. [et al.]. Kinetics and Mechanism of Synthesis of Carboxyl-Containing N-Vinyl-2-pyrrolidone Telechelics for Pharmacological Use // *Polymers*. 2021. Vol. 13, № 15. Art. 2569. DOI: 10.3390/polym13152569.
197. Nechaeva A., Artyukhov A., Luss A. [et al.]. Synthesis of Amphiphilic Copolymers of N-Vinyl-2-pyrrolidone and Allyl Glycidyl Ether for Co-Delivery of Doxorubicin and Paclitaxel // *Polymers*. 2022. Vol. 14, № 9. Art. 1727. DOI: 10.3390/polym14091727.

198. Knop K., Hoogenboom R., Fischer D. [et al.]. Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives // *Angewandte Chemie International Edition*. 2010. Vol. 49, № 36. P. 6288–6308. DOI: 10.1002/anie.200902672.
199. Hoang Thi T. T., Pilkington E. H., Nguyen D. H. [et al.]. The Importance of Poly(ethylene glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug Delivery and Bioconjugation // *Polymers*. 2020. Vol. 12, № 2. Art. 298. DOI: 10.3390/polym12020298.
200. Gao Y., Joshi M., Zhao Z. [et al.]. PEGylated Therapeutics in the Clinic // *Bioengineering & Translational Medicine*. 2024. Vol. 9, № 1. Art. e10600. DOI: 10.1002/btm2.10600.
201. D'Souza A. A., Shegokar R. Polyethylene Glycol (PEG): A Versatile Polymer for Pharmaceutical Applications // *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2016. Vol. 13, № 9. P. 1257–1275. DOI: 10.1080/17425247.2016.1182485.
202. Greenwald R. B. PEG Drugs: An Overview // *Journal of Controlled Release*. 2001. Vol. 74, № 1–3. P. 159–171. DOI: 10.1016/S0168-3659(01)00331-5.
203. Giamblanco N., Marletta G., Graillot A. [et al.]. Serum Protein-Resistant Behavior of Multisite-Bound Poly(ethylene glycol) Chains on Iron Oxide Surfaces // *ACS Omega*. 2017. Vol. 2, № 4. P. 1309–1320. DOI: 10.1021/acsomega.7b00007.
204. Ibrahim M., Ramadan E., Elsadek N. E. [et al.]. Polyethylene Glycol (PEG): The Nature, Immunogenicity, and Role in the Hypersensitivity of PEGylated Products // *Journal of Controlled Release*. 2022. Vol. 351. P. 215–230. DOI: 10.1016/j.jconrel.2022.09.031.
205. Shiraishi K. Considering the Immunogenicity of PEG: Strategies for Overcoming Issues with PEGylated Nanomedicines // *Nanomedicine*. 2025. Vol. 20, № 18. P. 2375–2391. DOI: 10.1080/17435889.2025.2538423.

206. Chen Y., Su Y.-C., Roffler S. R. Polyethylene Glycol Immunogenicity in Nanomedicine // *Nature Reviews Bioengineering*. 2025. Vol. 3. P. 742–760. DOI: 10.1038/s44222-025-00321-6.
207. Humphries J., Warne N. M., Feeney O. M. [et al.]. Poly(2-oxazoline) and Poly(2-oxazine)-Based Nanomedicines: Advancements, Opportunities and Challenges // *Journal of Controlled Release*. 2026. Vol. 394. Art. 114838. DOI: 10.1016/j.jconrel.2026.114838.
208. Konradi R., Pidhatika B., Mühlebach A. [et al.]. Poly-2-methyl-2-oxazoline: A Peptide-Like Polymer for Protein-Repellent Surfaces // *Langmuir*. 2008. Vol. 24, № 3. P. 613–616. DOI: 10.1021/la702566m.
209. Mint K., Morrow J. P., Warne N. M. [et al.]. Comparison of the Hydrophilicity of Water-Soluble Poly(2-alkyl-2-oxazoline)s, Poly(2-alkyl-2-oxazine)s and Poly(2,4-dialkyl-2-oxazoline)s // *Polymer Chemistry*. 2024. Vol. 15, № 26. P. 2662–2676. DOI: 10.1039/D4PY00332B.
210. Teodorescu M., Bercea M. Poly(vinylpyrrolidone): A Versatile Polymer for Biomedical and Beyond Medical Applications // *Polymer-Plastics Technology and Engineering*. 2015. Vol. 54, № 9. P. 923–943. DOI: 10.1080/03602559.2014.979506.
211. Kurakula M., Koteswara Rao G. S. N. Pharmaceutical Assessment of Polyvinylpyrrolidone (PVP): As Excipient from Conventional to Controlled Delivery Systems with a Spotlight on COVID-19 Inhibition // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020. Vol. 60. Art. 102046. DOI: 10.1016/j.jddst.2020.102046.
212. Bayliss N., Schmidt B. V. K. J. Hydrophilic Polymers: Current Trends and Visions for the Future // *Progress in Polymer Science*. 2023. Vol. 147. Art. 101753. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2023.101753.
213. Tsatsakis A., Stratidakis A. K., Goryachaya A. V. [et al.]. In Vitro Blood Compatibility and In Vitro Cytotoxicity of Amphiphilic Poly-N-vinylpyrrolidone Nanoparticles // *Food and Chemical Toxicology*. 2019. Vol. 127. P. 42–52. DOI: 10.1016/j.fct.2019.02.041.

214. Nechaeva A. M., Artyukhov A. A., Luss A. L. [et al.]. The Synthesis and Properties of a New Carrier for Paclitaxel and Doxorubicin Based on the Amphiphilic Copolymer of N-vinyl-2-pyrrolidone and Acrylic Acid // *Macromolecular Chemistry and Physics*. 2022. Vol. 223, № 17. Art. 2200081. DOI: 10.1002/macp.202200081.
215. Artyukhov A. A., Nechaeva A. M., Shtilman M. I. [et al.]. Nanoaggregates of Biphilic Carboxyl-Containing Copolymers as Carriers for Ionically Bound Doxorubicin // *Materials*. 2022. Vol. 15, № 20. Art. 7136. DOI: 10.3390/ma15207136.
216. Kuskov A., Nikitovic D., Berdiaki A. [et al.]. Amphiphilic Poly-N-vinylpyrrolidone Nanoparticles as Carriers for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Pharmacokinetic, Anti-Inflammatory, and Ulcerogenic Activity Study // *Pharmaceutics*. 2022. Vol. 14, № 5. Art. 925. DOI: 10.3390/pharmaceutics14050925.
217. Sakata S., Inoue Y., Ishihara K. Molecular Interaction Forces Generated during Protein Adsorption to Well-Defined Polymer Brush Surfaces // *Langmuir*. 2015. Vol. 31, № 10. P. 3108–3114. DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b00351.
218. Atif M., Balasini A. Mixed Polymer Brushes for Controlled Protein Adsorption: State of the Art and Future Prospective // *Materials Advances*. 2024. Vol. 5. P. 1420–1439. DOI: 10.1039/D3MA00935A.
219. Liu Y., Nevanen T. K., Paananen A. [et al.]. Self-Assembling Protein–Polymer Bioconjugates for Surfaces with Antifouling Features and Low Nonspecific Binding // *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2019. Vol. 11, № 3. P. 3599–3608. DOI: 10.1021/acsami.8b19968.
220. Ngo B. K. D., Grunlan M. A. Protein-Resistant Polymeric Biomaterials // *ACS Macro Letters*. 2017. Vol. 6, № 9. P. 992–1000. DOI: 10.1021/acsmacrolett.7b00448.
221. Okuyama H., Sugawara Y., Yamaguchi T. Quantitative Comparison of Protein Adsorption on Polyethylene Glycol and Zwitterionic Brushes: A Machine

Learning Approach // ACS Applied Polymer Materials. 2025. Vol. 7, № 18. DOI: 10.1021/acsapm.5c01902.

222. Bernhard C., Roeters S. J., Bauer K. N. [et al.]. Both Poly(ethylene glycol) and Poly(methyl ethylene phosphate) Guide Oriented Adsorption of Specific Proteins // *Langmuir*. 2019. Vol. 35, № 43. P. 14092–14097. DOI: 10.1021/acs.langmuir.9b02275.

223. Smith J. R., Cicerone M. T., Meuse C. W. Tertiary Structure Changes in Albumin upon Surface Adsorption Observed via Fourier Transform Infrared Spectroscopy // *Langmuir*. 2009. Vol. 25, № 8. P. 4571–4578. DOI: 10.1021/la802955w.

224. Servagent-Noinville S., Revault M., Quiquampoix H. [et al.]. Conformational Changes of Bovine Serum Albumin Induced by Adsorption on Different Clay Surfaces: FTIR Analysis // *Journal of Colloid and Interface Science*. 2000. Vol. 221, № 2. P. 273–283. DOI: 10.1006/jcis.1999.6576.

225. Tsai D.-H., DelRio F. W., Keene A. M. [et al.]. Adsorption and Conformation of Serum Albumin Protein on Gold Nanoparticles Investigated Using Dimensional Measurements and In Situ Spectroscopic Methods // *Langmuir*. 2011. Vol. 27, № 6. P. 2464–2477. DOI: 10.1021/la104124d.

226. Shang L., Wang Y., Jiang J. [et al.]. pH-Dependent Protein Conformational Changes in Albumin: Gold Nanoparticle Bioconjugates: A Spectroscopic Study // *Langmuir*. 2007. Vol. 23, № 5. P. 2714–2721. DOI: 10.1021/la062064e.

227. Ziaee E., Shareghi B., Farhadian S. A Comparative Study of Structural and Dynamical Properties of Bovine Serum Albumin in the Presence of Spermine // *Journal of Molecular Liquids*. 2021. Vol. 332. Art. 115853. DOI: 10.1016/j.molliq.2021.115853.

228. Westmeier D., Knauer S. K., Stauber R. H. [et al.]. Bio–Nano Interactions // *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials*. 2nd ed. Academic Press, 2017. P. 1–12. DOI: 10.1016/B978-0-12-809199-9.00001-X.

229. Zelepukin I. V., Shevchenko K. G., Deyev S. M. Rediscovery of Mononuclear Phagocyte System Blockade for Nanoparticle Drug Delivery // *Nature Communications*. 2024. Vol. 15. Art. 4366. DOI: 10.1038/s41467-024-48838-5.
230. Mespouille L., Coulembier O., Kawalec M. [et al.]. Implementation of Metal-Free Ring-Opening Polymerization in the Preparation of Aliphatic Polycarbonate Materials // *Progress in Polymer Science*. 2014. Vol. 39, № 6. P. 1144–1164. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2014.02.003.
231. Maier R., Fries M. R., Buchholz C. [et al.]. Human versus Bovine Serum Albumin: A Subtle Difference in Hydrophobicity Leads to Large Differences in Bulk and Interface Behavior // *Crystal Growth & Design*. 2021. Vol. 21, № 9. P. 5451–5459. DOI: 10.1021/acs.cgd.1c00730.
232. Yan Q., Yan Q., Shen H. [et al.]. Changes in Kidney Functions Following Acute Infusion of Low Molecular Weight Polyvinylpyrrolidone in Male Rats // *Physiological Reports*. 2025. Vol. 13, № 7. Art. e70295. DOI: 10.14814/phy2.70295.
233. Madeo F., Carmona-Gutierrez D., Kepp O. [et al.]. Spermidine in Health and Disease // *Science*. 2018. Vol. 359, № 6374. Art. eaan2788. DOI: 10.1126/science.aan2788.
234. Zhu X., Lu P., Chen W., Dong J. Studies of UV Crosslinked Poly(N-vinylpyrrolidone) Hydrogels by FTIR, Raman and Solid-State NMR Spectroscopies // *Polymer*. 2010. Vol. 51, № 14. P. 3054–3063. DOI: 10.1016/j.polymer.2010.05.006.
235. Saroj A. L., Singh R. K., Chandra S. Studies on Polymer Electrolyte Poly(vinyl pyrrolidone) Complexed with Ionic Liquid: Effect of Complexation on Thermal Stability, Conductivity and Relaxation Behaviour // *Materials Science and Engineering: B*. 2013. Vol. 178, № 4. P. 231–238. DOI: 10.1016/j.mseb.2012.11.007.
236. Rahma A., Munir M. M., Khairurrijal, Prasetyo A., Suendo V., Rachmawati H. Intermolecular Interactions and the Release Pattern of

Electrospun Curcumin–Polyvinyl(pyrrolidone) Fiber // Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2016. Vol. 39, № 2. P. 163–173. DOI: 10.1248/bpb.b15-00391.

237. Xiao D., Chen D., Zhou Z., Zhong A. Three-Group Type Mechanism in the Curing Behavior of Polyacrylate and Blocked Toluene Diisocyanate // Journal of Applied Polymer Science. 2002. Vol. 83, № 1. P. 112–120. DOI: 10.1002/app.2233.

238. Chatterjee S., Mukherjee T. K. Spectroscopic Investigation of Interaction between Bovine Serum Albumin and Amine-Functionalized Silicon Quantum Dots // Physical Chemistry Chemical Physics. 2014. Vol. 16. P. 8400–8408. DOI: 10.1039/C4CP00372A.

239. Barmin R. A., Maksimova E. A., Rudakovskaya P. G. [et al.]. Albumin Microbubbles Conjugated with Zinc and Aluminum Phthalocyanine Dyes for Enhanced Photodynamic Activity // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2022. Vol. 219. Art. 112856. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2022.112856.

240. Liu M., Dasgupta A., Qu N. [et al.]. Strategies to Maximize Anthracycline Drug Loading in Albumin Microbubbles // ACS Biomaterials Science & Engineering. 2024. Vol. 10, № 1. P. 82–88. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.1c01203.

241. Rovers T. A. M., Sala G., van der Linden E. [et al.]. Temperature Is Key to Yield and Stability of BSA Stabilized Microbubbles // Food Hydrocolloids. 2016. Vol. 52. P. 106–115. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.05.038.

242. Maksimova E. A., Barmin R. A., Rudakovskaya P. G. [et al.]. Air-Filled Microbubbles Based on Albumin Functionalized with Gold Nanocages and Zinc Phthalocyanine for Multimodal Imaging // Micromachines. 2021. Vol. 12, № 10. Art. 1161. DOI: 10.3390/mi12101161.

243. McPhie P. Circular Dichroism Studies on Proteins in Films and in Solution: Estimation of Secondary Structure by g-Factor Analysis // Analytical Biochemistry. 2001. Vol. 293, № 1. P. 109–119. DOI: 10.1006/abio.2001.5113.

244. Kelly S. M., Jess T. J., Price N. C. How to Study Proteins by Circular Dichroism // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005. Vol. 1751, № 2. P. 119–139. DOI: 10.1016/j.bbapap.2005.06.005.
245. Lin X.-J., Zhang F., Xie Y.-Y. [et al.]. Secondary Structural Formation of α -Synuclein Amyloids as Revealed by g-Factor of Solid-State Circular Dichroism // *Biopolymers*. 2006. Vol. 83, № 3. P. 226–232. DOI: 10.1002/bip.20550.
246. Zeeshan F., Tabbassum M., Jorgensen L. [et al.]. Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared (ATR FT-IR) Spectroscopy as an Analytical Method to Investigate the Secondary Structure of a Model Protein Embedded in Solid Lipid Matrices // *Applied Spectroscopy*. 2018. Vol. 72, № 2. P. 268–279. DOI: 10.1177/0003702817739908.
247. Usoltsev D., Sitnikova V., Kajava A. [et al.]. Systematic FTIR Spectroscopy Study of the Secondary Structure Changes in Human Serum Albumin under Various Denaturation Conditions // *Biomolecules*. 2019. Vol. 9, № 8. Art. 359. DOI: 10.3390/biom9080359.
248. Lohse D. Bubble Puzzles: From Fundamentals to Applications // *Physical Review Fluids*. 2018. Vol. 3, № 11. Art. 110504. DOI: 10.1103/PhysRevFluids.3.110504.
249. Komarov S., Oda K., Ishiwata Y., Dezhkunov N. Characterization of Acoustic Cavitation in Water and Molten Aluminum Alloy // *Ultrasonics Sonochemistry*. 2013. Vol. 20, № 2. P. 754–761. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2012.10.006.
250. Beris A. N., Horner J. S., Jariwala S. [et al.]. Recent Advances in Blood Rheology: A Review // *Soft Matter*. 2021. Vol. 17, № 47. P. 10591–10613. DOI: 10.1039/D1SM01212F.
251. Rajora M. A., Dhaliwal A., Zheng M. [et al.]. Quantitative Pharmacokinetics Reveal Impact of Lipid Composition on Microbubble and Nanoprogeny Shell Fate // *Advanced Science*. 2024. Vol. 11, № 4. Art. 2304453. DOI: 10.1002/advs.202304453.