

САМООРГАНИЗУЮЩИЕСЯ СТРУКТУРЫ И НАНОСБОРКИ

УДК 541.6+544.1

ПОЛИМЕРНАЯ СИСТЕМА “ПЭГ–ДЕКСТРАН” ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ НАНОРАЗМЕРНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

© 2023 г. М. А. Слюсаренко^{1,2}, Н. П. Евлампиева^{1,*}, О. С. Везо¹, А. В. Малек²

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: n.yevlampieva@spbu.ru

Поступила в редакцию 29.12.2022 г.

После доработки 27.04.2023 г.

Принята к публикации 14.08.2023 г.

Показано, что двухфазная полимерная система “полиэтиленгликоль–декстран” может с высокой эффективностью использоваться для выделения наноразмерных везикул из плазмы крови человека, и предложена соответствующая методика. Определены оптимальные параметры системы для этой цели: молекулярная масса полимеров, их весовое соотношение, рабочая температура; исследован механизм взаимодействия компонентов полимерной системы с компонентами плазмы. Установлено, что выделение везикул в заданном размерном диапазоне обусловлено выбором состава полимерной системы в области ниже ее бинодали и соблюдением определенного количественного соотношения гидродинамических объемов молекул декстрана и полиэтиленгликоля в плазме. Предлагаемая методика является недорогим и удобным способом концентрирования везикул для их последующего биохимического анализа.

DOI: 10.56304/S1992722323060122

ВВЕДЕНИЕ

Двухфазные системы на основе гидрофильных полимеров, таких как поливинилпирролидон, полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль и их сополимеры, производные декстрана известны продолжительное время, но применяются они в основном только в лабораторных условиях. Наиболее часто двухфазную полимерную систему формируют либо добавлением низкомолекулярной соли к раствору высокомолекулярного соединения, либо из двух несовместимых в водной среде полимеров. Такие системы представляют интерес для выделения или разделения биообъектов: клеток и их органелл, ферментов, протеинов, пептидов, если они не разрушают и не денатурируют перечисленные объекты [1–4]. Успешным применением двухфазных систем считается тогда, когда удастся сконцентрировать выделяемый объект в одной из фаз, либо на межфазной границе. Метод считается сугубо эмпирическим, требует экспериментального подбора параметров выбранной системы и определения условий ее эффективности по отношению к выделяемому объекту, что объясняет ограниченное использование двухфазных полимерных систем (ДПС) в аналитике и биотехнологиях. Изучение поведения ДПС и закономерностей их функционирования актуально в связи с большим количеством

возможных применений. Отметим, что разделение смесей биообъектов с помощью ДПС, основанное на аффинных принципах, в рамках проведенного исследования не рассматривается.

Данная работа связана с изучением возможности выделения везикулярных компонент (везикул) плазмы крови с использованием ДПС. Везикулы – это мембранные образования, содержащиеся во всех биологических жидкостях организма. Они состоят из липидной оболочки с расположенными на ее поверхности наборами белков, состав которых зависит от продуцировавших их клеток, а также внутреннего наполнения, включающего в себя белки, липиды, нуклеиновые кислоты и другие соединения [5–7]. Интерес к везикулам существенно вырос в последние годы в связи с присуждением в 2013 г. Нобелевской премии по физиологии и медицине Д. Ротману, Р. Шекману и Т. Зюдифу за открытие системы везикулярного транспорта и в связи с доказательством высокой диагностической значимости этих объектов [6–8]. Размер везикул варьируется от микронных до наноразмерных. Основная функция внеклеточных наноразмерных везикул (ВНВ) в живых организмах связана с осуществлением межклеточного обмена. Термин ВНВ принято использовать для везикул размером от 30 до 150 × 10⁻⁷ см. Диагностический потенциал ВНВ пока невозможно реа-

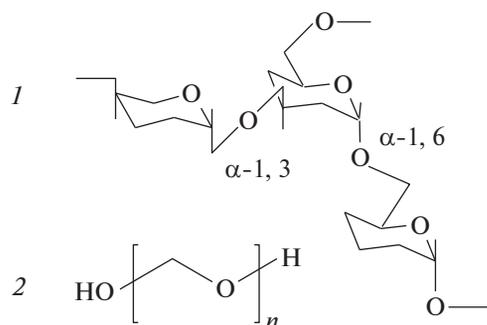


Рис. 1. Структура декстрана (1) и ПЭГ (2).

лизовать в полной мере из-за отсутствия достаточно простых и надежных методов выделения и анализа этих частиц. Несмотря на то что в последние годы был достигнут некоторый прогресс в решении проблемы выделения везикул, в частности с применением мембранных технологий [9, 10], до настоящего времени стандартом выделения ВНВ из плазмы крови считается двухэтапное ультрацентрифугирование при 110000 g [11]. Поэтому поиск альтернативных методик выделения везикул из биологических жидкостей остается актуальным.

В данной работе в качестве “инструмента” для выделения ВНВ выбрана ДПС “полиэтиленгликоль–декстран” (“ПЭГ–декстран”), состоящая из биосовместимых, нетоксичных и коммерчески доступных полимеров. Для выделения ВНВ из плазмы крови данная ДПС не применялась. Можно найти примеры использования этой системы для целевого выделения различных биообъектов [1, 3, 12–14], но, к сожалению, общие критерии, на которые можно было бы опереться при выборе таких параметров ДПС, как молекулярная масса (ММ) полимеров или их количественное соотношение, не сформулированы. Кроме указанных параметров для практического применения ДПС требуется дополнительно подбирать температуру, pH среды, величину ионной силы, состав низкомолекулярных ионов [1–4].

Задачей работы помимо определения критериев применимости ДПС “ПЭГ–декстран” для выделения везикул определенных размеров из плазмы крови человека было исследование механизмов взаимодействия полимеров ДПС с компонентами плазмы в критических условиях близости к бинальной системе. Одной из задач также была количественная оценка эффективности выделения наноразмерных везикул плазмы с помощью ДПС “ПЭГ–декстран” для их последующего анализа. Работа имеет прямое отношение к разработке новых методов жидкостной биопсии с использованием везикул плазмы крови для раннего выявления и мониторинга онкологических заболеваний.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для формирования ДПС использовали полимеры известных фирм-производителей (первая графа табл. 1), предназначенные для биомедицинского применения. Были приобретены шесть образцов ПЭГ и три образца декстрана в широком интервале ММ. Полимеры использовали без дополнительной очистки. Напомним, что ПЭГ – хорошо известный биосовместимый синтетический полимер (рис. 1), а декстран – полисахарид с вариативной степенью ветвления, зависящей от его происхождения.

Для данной работы выбрали образцы декстрана, производимые одним и тем же типом бактерий *Leuconostoc mesenteroides*, с невысокой разветвленностью – 5%. Мономеры основной полисахаридной цепи декстрана соединены связью α-1,6, тогда как звенья боковых ветвей присоединены через связи α-1,3 (рис. 1). Тип гликозидной связи в боковых цепях декстрана может варьироваться.

В качестве основного растворителя в работе использовали фосфатно-солевой буфер (ФСБ) при значении pH 7.4.

Метод статического рассеяния света использовали для определения средневесовых молекулярных масс M_w полимерных образцов. Измерения интенсивности рассеянного света в растворах полимеров в ФСБ проводили согласно стандартной процедуре в интервале углов рассеяния 30°–140° на установке Photocor Complex (Россия) ресурсного центра СПбГУ “Центр диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и наноэлектроники”. Источником света служил полупроводниковый лазер (25 мВт) с длиной волны 445 нм, обработку данных проводили методом двойной экстраполяции по Зимму [15].

Плотности и показатели преломления растворов определяли на плотномере DMA 500 M СК (Anton Paar) и рефрактометре Abbemat WR/MW (Anton Paar) указанного выше ресурсного центра.

Для определения гидродинамических размеров R_h объектов в растворе использовали два метода: динамическое рассеяние света (ДРС) [16] и анализ траекторий наночастиц (АТН) [17].

Измерения ДРС проводили в соответствующем режиме спектрометра Photocor Complex. Лазер (25 мВт) с длиной волны 654 нм использовали как источник излучения. Интервал углов рассеяния изменяли от 40° до 140°, измерения проводили при температуре 298 К. Спектры времен релаксации, полученные при регистрации рассеянного света под разными углами, анализировали с помощью программы DYNALS [18]. Для определения коэффициента диффузии получали зависимость обратного времени релаксации $1/\tau$ от квадрата волнового вектора q^2 для четырех–пяти концентраций. Аппроксимировали каждую из

Таблица 1. Гидродинамические характеристики образцов декстрана и ПЭГ в ФСБ при 298 К: характеристическая вязкость $[\eta]$, постоянная Хаггинса k' , инкремент плотности $\Delta\rho/\Delta c$, коэффициент поступательной диффузии D_0 , гидродинамический радиус R_h , молекулярная масса M_w , второй вириальный коэффициент A_2 и гидродинамический инвариант A_0

Образец	$[\eta] \cdot 10^{-2}$, см ³ /Г, (k')	$\Delta\rho/\Delta c$, г/см ³	$D_0 \cdot 10^8$, см ² /с	$R_h \cdot 10^7$, см	$M_w \cdot 10^{-3}$, г/моль	$A_2 \cdot 10^4$ моль · мл/Г ²	$A_0 \cdot 10^{10}$ (СГС)
Декстран-1 (Loba Chemi)	0.14 ± 0.01 (0.53)	0.351 ± 0.007	66 ± 7	3.6 ± 0.4	19.4 ± 0.2	3.9 ± 0.4	2.7 ± 0.5
Декстран-2 (Serva)	0.36 ± 0.03 (0.55)	0.364 ± 0.002	31 ± 5	8 ± 1	320 ± 10	2.0 ± 0.4	5.0 ± 0.8
Декстран-3 (Sigma-Aldrich)	0.48 ± 0.05 (0.46)	0.403 ± 0.001	20 ± 2	11.9 ± 0.3	470 ± 10	1.7 ± 0.3	3.8 ± 0.4
ПЭГ-1 (Serva)	0.18 ± 0.01 (0.54)	0.162 ± 0.002	104 ± 10	2.3 ± 0.4	4.9 ± 0.5		3.1 ± 0.3
ПЭГ-2 (Sigma-Aldrich)	0.21 ± 0.01 (0.49)	0.161 ± 0.001	91 ± 9	2.6 ± 0.3	6.6 ± 0.5		3.1 ± 0.3
ПЭГ-3 (Loba Chemi)	0.28 ± 0.02 (0.46)	0.161 ± 0.001	62 ± 6	3.8 ± 0.4	12 ± 1	30 ± 3	2.9 ± 0.3
ПЭГ-4 (Loba Chemi)	0.11 ± 0.01 (0.62)	0.151 ± 0.002	112 ± 12	2.1 ± 0.2	9 ± 1		3.4 ± 0.4
ПЭГ-5 (Sigma)	0.49 ± 0.04 (0.20)	0.136 ± 0.004	57 ± 6	4.2 ± 0.2	17 ± 1	27 ± 2	3.6 ± 0.3
ПЭГ-6 (Sigma)	0.63 ± 0.01 (0.25)	0.162 ± 0.002	41 ± 4	5.8 ± 0.1	26.2 ± 0.5	25 ± 4	3.2 ± 0.3

полученных зависимостей линейной функцией. По данным аппроксимации из наклонов прямых получали коэффициенты диффузии D при каждой концентрации, а затем концентрационную зависимость D , которая при экстраполяции к $c \rightarrow 0$ позволяла определить значения $D_0 = \lim_{c \rightarrow 0} D$ (табл. 1). Типичные распределения частиц по размерам в растворах образцов ПЭГ и декстрана, полученные методом ДРС, показаны на рис. 2. Пример обработки данных ДРС приведен для одного из образцов ПЭГ на рис. 3, концентрационные зависимо-

сти коэффициентов поступательной диффузии D для образцов декстрана в ФСБ показаны на рис. 4.

Гидродинамические радиусы R_h макромолекул и частиц в исследованных растворах получали с использованием соотношения Стокса–Эйнштейна (1) и экспериментально определенных коэффициентов поступательной диффузии D_0 :

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta_0 D_0}, \tag{1}$$

где k – постоянная Больцмана, η_0 – вязкость растворителя, T – температура.

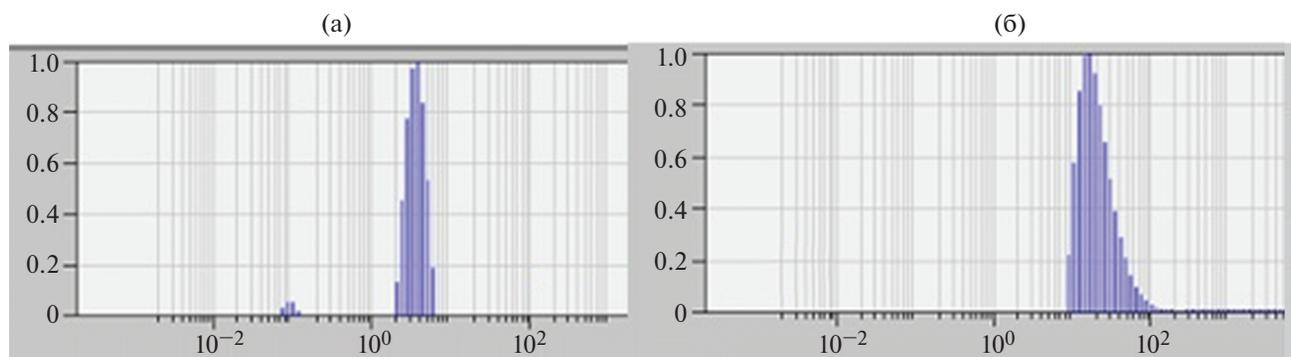


Рис. 2. Нормализованные распределения частиц по размерам в ФСБ для ПЭГ-6 при концентрации 1.495×10^{-2} г/см³ и угле рассеяния 80° (а) и для декстрана-2 при концентрации 0.05×10^{-2} г/см³ и угле рассеяния 90° (б), полученные методом ДРС.

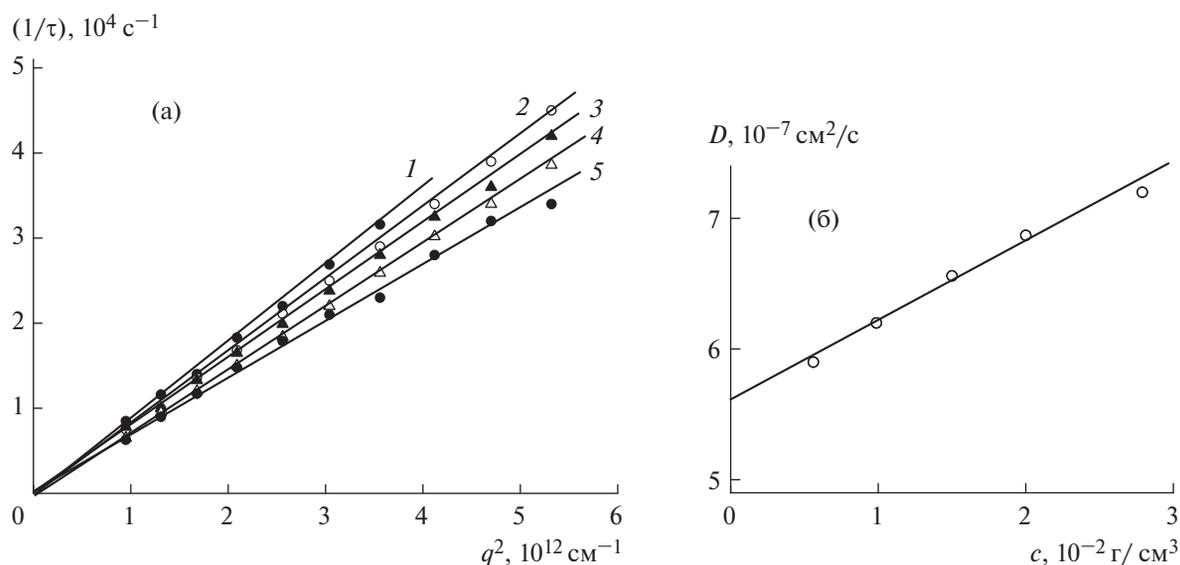


Рис. 3. Зависимости обратных времен релаксации $1/\tau$ флуктуаций концентрации частиц в растворе от квадрата вектора рассеяния (а) и соответствующая концентрационная зависимость коэффициентов диффузии D для ПЭГ-5 в ФСБ при 298 К (б). Измерения проводили при концентрациях $c_1 = 2.967$, $c_2 = 1.992$, $c_3 = 1.503$, $c_4 = 0.991$ и $c_5 = 0.573 \cdot 10^{-2}$ г/см³. Времена релаксации определяли по положению максимумов распределений, распределения были мономодальными.

Метод АТН относительно новый, в данной работе использовался для определения размера и концентрации выделенных ВНВ. Измерения проводили на анализаторе Nanosight NS300 (“Malvern”, США). Обработку спектров проводили в Nanosight NTA 3.2 Software. Проводили четыре–пять измерений для разных проб раствора одного и того же образца. Каждое измерение имело длительность 60 с, что соответствовало 1498 кадрам. Измерения были выполнены при 298 К. Метод АТН основан на фиксации смещений наноча-

стиц за счет броуновского движения в реальном времени. Фиксация координат частиц во времени происходит при наблюдении смещения пятна дифракции света при попадании лазерного пучка на частицы. Из уравнения среднего смещения броуновской частицы (2) за выбранный интервал времени можно вычислить коэффициент диффузии:

$$r_{xyz}^2 = 6Dt, \quad (2)$$

где r_{xyz}^2 – средний квадрат смещения броуновской частицы, D – коэффициент диффузии, t – время наблюдения за частицей.

Гидродинамический радиус частиц R_h , так же как в методе ДРС, вычисляли, используя соотношение (1).

Характеристическая вязкость $[\eta]$ полимера в растворе является его важным гидродинамическим параметром, зависящим от свойств как полимера, так и растворителя:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_0 - \eta}{\eta_0 c} \right), \quad (3)$$

где η – вязкость раствора, η_0 – вязкость растворителя, c – концентрация раствора.

Величину $[\eta]$ определяли экстраполяцией к $c \rightarrow 0$ по методу Хаггинса:

$$\eta_{sp}/c = [\eta] + k'[\eta]^2 c + \dots \quad (4)$$

где η_{sp}/c – приведенная вязкость, k' – константа Хаггинса [20].

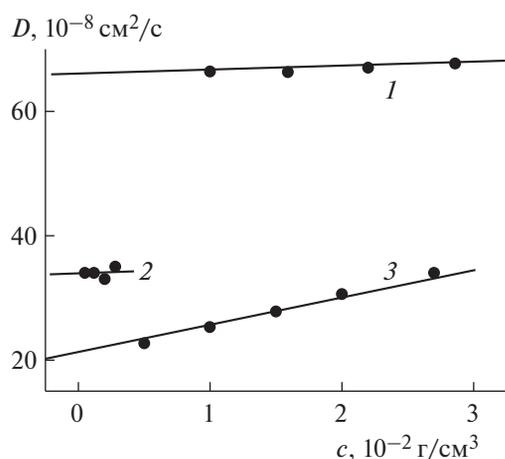


Рис. 4. Концентрационные зависимости коэффициента диффузии D для образцов декстрана в ФСБ при 298 К, полученные методом ДРС. Номера прямых соответствуют номерам образцов декстрана в табл. 1.

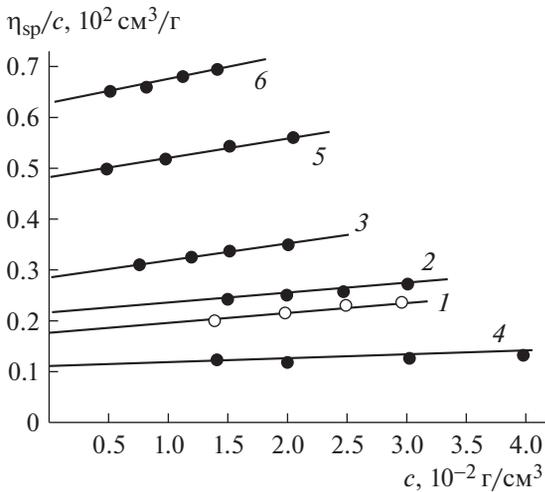


Рис. 5. Концентрационная зависимость приведенной вязкости (η_{sp}/c) для образцов ПЭГ в фосфатно-солевом буферном растворителе при 298 К. Номера прямых соответствуют номерам образцов ПЭГ в табл. 1.

Для измерений использовали автоматизированный микровискозиметр Lovis 2000 М/МЕ на основе метода Гепплера. Прибор позволяет определять время качения шарика при разных углах наклона капилляра, заполненного раствором или растворителем. Измерения проводили при двух углах наклона капилляра вискозиметра 50° и 55° , время качения шарика фиксировали 5–6 раз, результат измерений усредняли для каждой из концентраций раствора. Величину η_{sp}/c вычисляли как $(t - t_0)/t_0c$, где t и t_0 – время движения шарика в растворе и растворителе. Концентрационные зависимости η_{sp}/c для образцов ПЭГ показаны на рис. 5.

Денситометр DMA 5000M (Anton Paar, Австрия) применяли для определения плотности растворов полимеров.

Фазовые диаграммы получали в воде при 298 К, используя известные критические соотношения ПЭГ и декстрана близкой ММ при комнатной температуре [1, 2]. Это существенно сократило этап грубого подбора интервала концентраций для изучения фазового поведения систем ПЭГ–декстран. Далее к 1 см^3 совместного раствора декстрана и ПЭГ в кювете для спектрофотометра СФ-56 при соотношении компонентов, близком к критическому, добавляли раствор ПЭГ известной концентрации, медленно вводя его дозатором по 0.2 см^3 через 5 мин и измеряя величину оптического поглощения раствора на длине волны 300 нм. При разделении фаз наблюдали резкое снижение величины оптического поглощения раствора на 15–20% относительно предшествующего измерения. Положение точки на бинодали ДПС определяли, рассчитывая точное соотношение концентраций ПЭГ и декстрана с учетом введенного дополнительно раствора ПЭГ. Фазовые диаграммы, приведенные ниже, получали сглаживанием экспериментальной кривой, проведенной по восьми точкам.

Метод криогенной просвечивающей электронной микроскопии (**крио-ПЭМ**) применяли для визуализации ВНВ, выделенных из плазмы. Медную сетку, покрытую углеродной пленкой (TEM-LC200CU25, Sigma-Aldrich, США), обрабатывали (15 с , O_2/H_2) на устройстве для гидрофильной очистки Jeol EM-39010. Суспензию ВНВ (4 мкл) наносили на сетку в климатической камере (относительная влажность 90%, температура 20°C). Избыточную суспензию удаляли с помощью фильтровальной бумаги, полученную пленку замораживали в жидком этане с помощью автоматического устройства быстрой заморозки образцов Leica EM GP. Изображения образцов получали при -170°C на крио-держателе Gatan 914 для крио-ПЭМ-визуализации на просвечивающем электронном микроскопе JEM-2100 (Jeol,

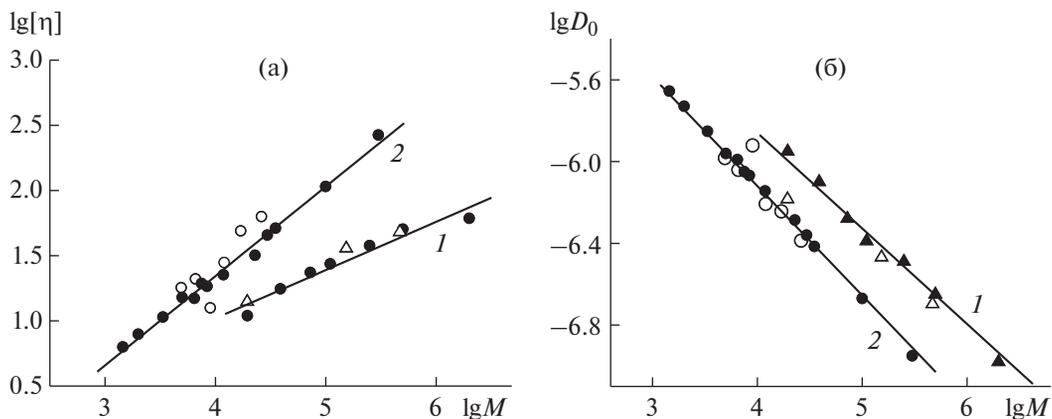


Рис. 6. Молекулярно-массовые зависимости характеристической вязкости $[\eta]$ (а) и коэффициента диффузии D_0 (б) для образцов декстрана (1) и ПЭГ (2) в фосфатно-солевом буфере при 298 К; светлые точки – данная работа, темные – [21].

Япония). Микрофотографии получали с помощью камеры Gatan Ultrascan 4000 при увеличении либо $\times 30000$, либо $\times 15000$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Плазма крови млекопитающих – это многокомпонентная биологическая жидкость, содержащая помимо внеклеточных везикул протеины, нуклеиновые кислоты, липиды, витамины и другие составляющие. В этом отношении плазма представляет собой сложный объект для изучения механизма взаимодействия полимеров ДПС с разными по строению биологическими микро- и наночастицами, отличающимися по своим физическим и биохимическим свойствам. Данная работа в значительной степени базируется на физическом подходе, основанном на размерном критерии при изучении результата взаимодействия частиц в многокомпонентной среде. Такой подход позволил упростить рассмотрение процессов, происходящих при расслоении ДПС “ПЭГ–декстран” непосредственно в плазме крови.

Гидродинамические характеристики полимеров ДПС. Положение бинодали фазовой диаграммы двухфазных полимерных систем зависит от ММ каждого из ее компонентов. Сведения об этом имеются и для обсуждаемой ДПС [12–14], поэтому выбранные образцы ПЭГ и декстрана (табл. 1) были охарактеризованы методом статического рассеяния света с целью определения их средне-весовой молекулярной массы M_w . Методы ДРС и вискозиметрии использовали для определения гидродинамических характеристик полимеров. Эти измерения проводили в ФСБ, который рассматривали как водную среду, подобную плазме, поскольку везикулы и белки сохраняют в ФСБ свою нативность. В табл. 1 приведены полученные характеристики полимеров в ФСБ, которые далее считали соответствующими тем же характеристикам в плазме.

Представленные в табл. 1 данные демонстрируют различие молекулярных свойств ПЭГ и декстрана в одном растворителе. ПЭГ – это линейный синтетический полимер, а декстран – полисахарид, имеющий слабо разветвленное строение (рис. 1). Различие в химической структуре и строении полимеров проявляется в конформационных и гидродинамических свойствах их молекул. Конформация ПЭГ – асимметричный статистический клубок, тогда как для разветвленных цепей декстрана пространственная форма молекул, очевидно, иная. Например, из табл. 1 видно, что гидродинамические радиусы R_h молекул ПЭГ и декстрана при близкой ММ сопоставимы (ПЭГ-5 с $M_w = 17 \times 10^3$ г/моль и декстран-1 с $M_w = 19.4 \times 10^3$ г/моль), но не их характеристическая вязкость $[\eta]$, зависящая от формы

молекул. Величина $[\eta]$ для ПЭГ-5 сопоставима с таковой для декстрана-3 с существенно более высокой молекулярной массой $M_w = 470 \times 10^3$ г/моль. Совокупность гидродинамических данных показывает, что в одном растворителе молекулы ПЭГ должны обладать существенно большим исключенным объемом, чем молекулы декстрана. В частности, как видно из табл. 1, инкремент плотности $\Delta\rho/\Delta c$ для декстрана выше, чем для ПЭГ.

Образцы ПЭГ в табл. 1 представляют собой гомологический ряд, поскольку полученные для него степенные показатели молекулярно-массовых зависимостей для $[\eta]$ и D хорошо соответствуют литературным данным (рис. 8).

Для декстрана как представителя класса разветвленных полисахаридов бактериального синтеза о подобном сопоставлении можно говорить лишь условно, поскольку его молекулярные свойства, обусловленные возрастающей с ММ разветвленностью, отличаются от полимеров цепного строения. Это было продемонстрировано в классической работе В. Бурхарда на фракциях декстрана в интервале ММ от десятков тысяч до десятков миллионов [22]. Однако в ограниченной области ММ ($20\text{--}500$) $\times 10^3$ г/моль при слабой степени разветвленности $\sim 5\%$ (как у изучаемых образцов) для декстрана допустима линейная аппроксимация молекулярно-массовых зависимостей [22, 23], поэтому с целью сопоставления свойств образцов декстрана с ранее опубликованными данными такая аппроксимация была сделана. Рисунки 6а и 6б демонстрируют близость $[\eta]$ и D исследованных в работе образцов данным, опубликованным для ПЭГ и декстрана в ФСБ ранее [21]. В то же время из рис. 6 видно, что наклоны зависимостей для ПЭГ и декстрана различаются, т.е. в ФСБ при 298 К полимеры имеют существенно разные показатели степени в соотношениях типа Марка–Куна–Хаувинка (МКХ). Для примера приведем соотношения МКХ для вязкости из [21], где были исследованы более однородные гомологические серии ПЭГ и декстрана: $[\eta] = (1.4 \pm 0.2) 10^{-3} M^{0.45 \pm 0.05}$ – декстран, $[\eta] = (4.3 \pm 0.4) 10^{-4} M^{0.67 \pm 0.07}$ – ПЭГ.

Как известно, в термодинамически идеальных условиях для полимера в растворе, когда внутримолекулярные взаимодействия и взаимодействие “полимер–растворитель” компенсируют друг друга (θ -условия, второй вириальный коэффициент $A_2 = 0$), его конформация не возмущена объемными эффектами, то показатель степени a_1 в уравнении МКХ для вязкости должен быть равен 0.5 [24]. Классическая теория Флори–Хаггинса [24] также предсказывает, что $A_2 > 0$ для растворов макромолекул в термодинамически хороших растворителях и $A_2 < 0$ в плохих растворителях. При этом показатель степени в уравнении МКХ в тер-

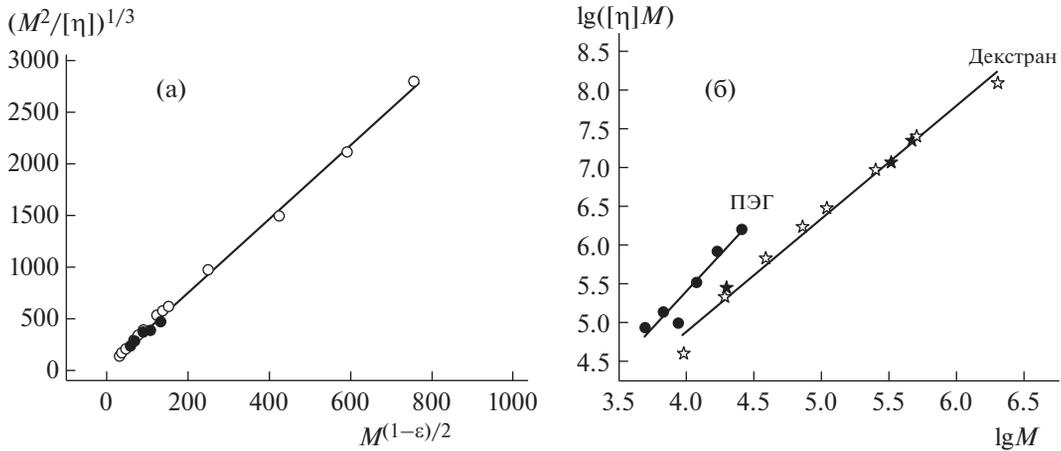


Рис. 7. Зависимость $(M^2/[\eta])^{1/3}$ от $M^{(1-\epsilon)/2}$ для образцов ПЭГ (а) и зависимость $[\eta]M$ от M в логарифмическом масштабе для ПЭГ и декстрана (б); темные точки – данная работа, светлые – [21].

модинамически плохих условиях для полимера $a_\eta < 0.5$, в хороших – $a_\eta > 0.5$ [24].

Для декстрана в водных растворителях второй вириальный коэффициент A_2 имеет положительные значения; сведения об этом можно найти как в научной периодике [21–24], так и в справочной литературе. Полученные в работе значения A_2 для образцов декстрана в ФСБ (табл. 1) подтверждают это и вполне соответствуют данным [21]. В то же время существует значительное число экспериментальных работ, в которых показатель степени в соотношении МКХ для характеристической вязкости декстрана в водно-солевых растворителях меньше 0.5 [21–23], хотя такие растворители не являются для него термодинамически плохими. То есть декстран, даже будучи слабо разветвленным полимером, отличается по своим молекулярным свойствам от полимеров линейного строения, к которым относится ПЭГ. Для последнего $A_2 > 0$ и $a_\eta > 0.5$, т.е. ФСБ для ПЭГ однозначно термодинамически хороший растворитель. Таким образом, причиной несовместимости ПЭГ и декстрана в одном растворителе является и химическое строение, и разная архитектура их макромолекул.

Отметим, что величина A_2 для рассматриваемых полимеров в ФСБ разная: значения A_2 для ПЭГ примерно на порядок выше, чем для декстрана при близкой ММ (табл. 1). Этот факт может свидетельствовать о неидентичности термодинамических условий в ФСБ для ПЭГ и декстрана. Ведь согласно классическим термодинамическим теориям, чем ближе к нулю значение A_2 , тем предпочтительнее для полимера внутримолекулярные взаимодействия, а не взаимодействие с растворителем.

На рис. 7а приведено построение для оценки равновесной термодинамической жесткости (или длины статистического сегмента Куна A) цепей ПЭГ. Это построение, основанное на гидродина-

мической теории Грэй–Блумфельда–Хирста [25, 29], позволяет определить величину A цепных макромолекул из наклона линейной зависимости $(M^2 [\eta])^{1/3} = f(M^{(1-\epsilon)/2})$ к оси абсцисс и диаметр цепи d из величины отрезка, отсекаемого ею на оси ординат и пропорционального $(\frac{A}{d})$:

$$\begin{aligned} (M^2 [\eta])^{1/3} = & \left[\frac{3}{\Phi_0^{1/3} (1-\epsilon)(3-\epsilon)} \right] \left(\frac{M_L^{1+\epsilon}}{A^2} \right) M^{\frac{1-\epsilon}{2}} + \\ & + \left(\frac{M_L P_0}{3\pi \Phi_0^{1/3}} \right) \left[\ln \left(\frac{A}{d} \right) - \frac{d}{3A} - \Phi(\epsilon) \right]. \end{aligned} \quad (5)$$

Концентрация декстрана, мас. %

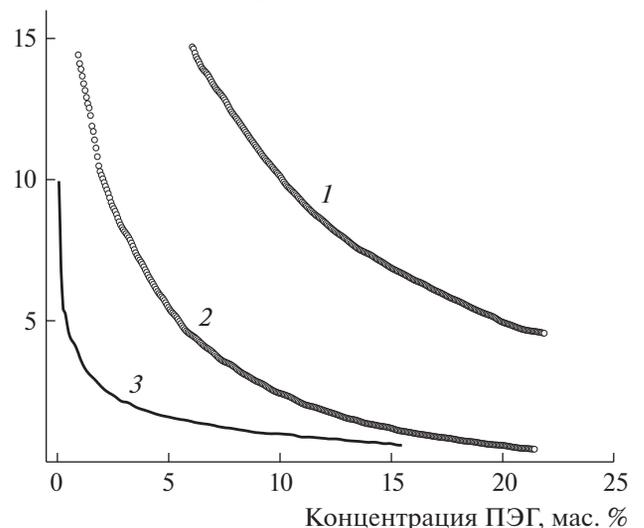


Рис. 8. Фазовые диаграммы для трех ДПС разного состава в воде при 298 К: декстран-1: ПЭГ-1 (1), декстран-1: ПЭГ-5 (2) и декстран-3: ПЭГ-5 (3).

Здесь Φ_0 и P_0 – параметры Флори, $M_L = M_o/l$ – молекулярная масса единицы длины молекулы, l – проекция мономерного звена на направление роста цепи, M_o – масса мономерного звена, $\varphi(\varepsilon) = 1.43 + 2.635\varepsilon + 4.709\varepsilon^2 + \dots$, ε – параметр гидродинамического взаимодействия полимер–растворитель, определяемый как $\varepsilon = \frac{(2a_{[\eta]} - 1)}{3}$, где $a_{[\eta]}$ – показатель степени в уравнении МКХ для характеристической вязкости [25].

Для ПЭГ в ФСБ из построения, приведенного на рис. 7а, получено значение длины сегмента Куна $A = (2.0 \pm 0.5) \times 10^{-7}$ см и $d = (0.2 \pm 0.1) \times 10^{-7}$ см; при этом были использованы следующие численные значения параметров, входящих в соотношение (5): $\varepsilon = 0.113$, $\Phi_0 = 2.86 \times 10^{23}$ моль⁻¹, $P_0 = 5.11$, $M_L = 154 \times 10^7$ г/(моль×см). Количественная оценка равновесной жесткости цепи ПЭГ подтверждает, что это типично гибкоцепной полимер [29].

Среди полисахаридов декстран, для которого доминирующий тип связи циклических мономеров α -1,6 (рис. 1), тоже относится к гибким полимерам в отличие, например, от целлюлозы с характерной для нее β -1,4 гликозидной связью. Доказательству гибкости цепей декстрана посвящено значительное число публикаций в конце XX века [26–28]. Например, основываясь на данных метода двойного лучепреломления в потоке и полагая, что вклад в оптическую анизотропию раствора вносят в основном только независимо ориентирующиеся в потоке линейные участки цепей декстрана, в [28] получили оценку термодинамической жесткости для таких участков $A = (1.5 \pm 0.5) \times 10^{-7}$ см. Невысокая равновесная жесткость декстрана и ПЭГ, несмотря на различие в химическом строении, предопределяет сильную зависимость конформации и размеров их молекул от термодинамических условий.

При обсуждении гидродинамических свойств полимеров в растворах принято оценивать величину гидродинамического инварианта A_0 (6). Гидродинамический инвариант отражает взаимозависимость всех параметров макромолекул в растворе через их ММ и постоянство их средних размеров в явлениях поступательного и вращательного трения. Обычно оценкой численного значения A_0 подтверждают комплементарность экспериментально полученных разными методами гидродинамических характеристик макромолекул [29]:

$$A_0 = \left(\frac{M[\eta]}{100} \right)^{1/3} \frac{\eta_0 D_0}{T}, \quad (6)$$

где M – средневесовая молекулярная масса полимера, $[\eta]$ – характеристическая вязкость, η_0 – вязкость растворителя, D_0 – коэффициент трансляционной диффузии при концентрации $c \rightarrow 0$, T – абсолютная температура.

Если для ряда образцов ПЭГ среднее значение гидродинамического инварианта получилось равным $(3.2 \pm 0.3) \times 10^{-10}$ г·см²·с⁻²·град⁻¹·моль^{-1/3}, что полностью соответствует значению A_0 для гибкоцепных полимеров в термодинамически хороших растворителях [29, 30], то для исследованных образцов декстрана значения A_0 различались большим разбросом (табл. 1), что может быть связано с несовпадением типа разветвленности и степени полидисперсности декстранов от разных производителей. Последнее отмечают многие исследователи полисахаридов бактериального происхождения, отдавая предпочтение использованию декстранов от одного производителя [21, 22]. В связи с этим констатируем, что архитектура и тип разветвленности декстрана, очевидно, отличаются от синтетических разветвленных полимеров как регулярных, так и нерегулярных, для которых наблюдают тенденцию к снижению величины A_0 в сравнении с полимерами цепного строения [30–32].

Универсальным параметром для сопоставления макромолекул разной топологии является их гидродинамическая плотность. Для этого используется построение $[\eta]M = f(M)$, поскольку величина произведения $[\eta]M$ пропорциональна объему V , занимаемому макромолекулой в растворе (7) [33]. Наклон зависимости $\lg([\eta]M)$ от $\lg M$ будет обратно пропорционален средней гидродинамической плотности полимерных молекул ($\sim \lg(1/\rho)$):

$$[\eta]M = \Phi_0 \langle h^2 \rangle^{3/2} \sim V, \quad (7)$$

где $\langle h^2 \rangle^{1/2}$ – среднеквадратичное расстояние между концами макромолекулы.

Чем меньше величина наклона, тем выше плотность полимерного клубка для сравниваемых полимеров [33, 34]. Из рис. 7б видно, что для декстрана линейная аппроксимация экспериментальных данных имеет меньший наклон, чем для ПЭГ, т.е. декстран в сравнении с ПЭГ обладает более плотной внутримолекулярной упаковкой в одинаковых внешних условиях. Этот вывод полностью согласуется с приведенными в табл. 1 величинами инкремента плотности $\Delta\rho/\Delta c$ для декстрана и ПЭГ в ФСБ.

Полученные оценки R_h молекул ПЭГ и декстрана в ФСБ (табл. 1) использовали для изучения взаимодействия этих полимеров с компонентами плазмы.

Таблица 2. Состав исследованных ДПС

	ПЭГ-1	ПЭГ-2	ПЭГ-3	ПЭГ-5	ПЭГ-6
Декстран-1	1 (7.5:10)*,	6 (15:3.4),	11 (15:2.5),	16 (12.5:1),	21 (12.5:1.3),
	2 (8:6),	7 (10:4),	12 (10:2.5),	17 (12.5:2.2),	22 (8.5:1.5),
	3 (13:7.5),	8 (8.5:5.6),	13 (7.5:5),	18 (6:5.5),	23 (5.9:3.8),
	4 (19:1),	9 (3.5:7.6),	14 (5:6),	19 (2.5:7),	24 (2.8:5),
	5 (11.6:5)	10 (3.5:10)	15 (7:9)	20 (2.7:10)	25 (1.1:9)
Декстран-2	26 (12.5:1),	31 (9:2),	36 (10:1.6),	41 (2:5),	46 (12:0.9),
	27 (15:2.5),	32 (12.5:2.5),	37 (12.5:2),	42 (2:2.5),	47 (7:0.8),
	28 (7.5:4.5),	33 (6:4),	38 (5:4),	43 (5:2.5),	48 (4:2),
	29 (3:5),	34 (2.5:5.5),	39 (2:5),	44 (10:1),	49 (0.8:2.8),
	30 (3:8)	35 (2.5:7)	40 (1:8)	45 (14:1.8)	50 (0.8:5)
Декстран-3	51 (14:2),	56 (2:6),	61 (10:1.4),	66 (3.5:1),	71 (3:1.5),
	52 (10:3),	57 (4:4),	62 (27.5:2.5),	67 (3.5:3.5),	72 (4.4:2),
	53 (7.5:4.6),	58 (2:4),	63 (3.8:4.7),	68 (1.5:5),	73 (2:3),
	54 (2.5:4.9),	59 (4:2.5),	64 (1:5),	69 (7.5:2),	74 (0.8:3.5),
	55 (1.2:8)	60 (14:2)	65 (1:9)	70 (1:3.5)	75 (0.8:4.7)

*Цифра перед скобками является порядковым номером ДПС. Например, запись 1 (7.5:10) означает: ДПС с порядковым номером один, 7.5 – мас. % декстрана-1, 10 – мас. % ПЭГ-1.

Отметим, что исследование гидродинамических свойств, в том числе молекулярно-массовых зависимостей, позволяет выявить особенности, которые важны для понимания поведения несоместимой пары полимеров в одном растворителе. Для ПЭГ и декстрана помимо различия в топологии их молекул и взаимодействия “полимер–растворитель” такой особенностью является различие в гидродинамической плотности макромолекул, обусловленной их структурой и занимаемым ими объемом в растворе.

Формирование ДПС в плазме и ее оптимизация для выделения ВНВ. Как следует из табл. 1, образцы ПЭГ и декстран были выбраны в достаточно широком интервале изменения ММ. Примеры фазовых диаграмм для конкретных пар “ПЭГ–декстран” приведены на рис. 8.

Положение бинодали ДПС сильно зависело от температуры и ММ каждого из полимеров системы, тогда как ионная сила заметного влияния на фазовую диаграмму не оказывала. Четкое разделение на две фазы в совместном растворе ПЭГ и декстрана получали, когда концентрационная композиция ДПС соответствовала непосредственно бинодали или лежала выше нее.

Методика подбора наиболее оптимальных условий для выделения везикул со средним гидродинамическим радиусом $R_h \sim 50 \times 10^{-7}$ см из плазмы для каждой пары образцов полимеров, представленных в табл. 1, была следующей: выбирали две композиции ПЭГ–декстран немного выше бинодали, одну на бинодали и две ниже бинодали, опираясь на фазовые диаграммы, полученные в воде (рис. 8). Плазму перед добавлением в нее смеси сухих полимеров очищали от клеточ-

ного детрита, крупных везикул и белковых конгломератов путем поэтапного центрифугирования ($300 \text{ g}/10'$ – $1000 \text{ g}/10'$ – $2500 \text{ g}/10'$), которое традиционно проводится перед выделением ВНВ любым другим методом [5–7, 11]. Затем декстран и ПЭГ растворяли в плазме в течение одного часа при 277 К при периодическом перемешивании. Эффективность выделения ВНВ оценивали путем анализа распределения частиц по размерам в составе нижней фазы после однократного применения ДПС, поскольку именно в нижней фазе было установлено наличие везикул. Для каждой из систем, представленных в табл. 2, проводили анализ распределения частиц через час после добавления полимеров в плазму при нескольких концентрациях вблизи фазовой кривой. Распределения по размерам частиц в нижней фазе изучали методом АТН. Критерием служило сопоставление с унимодальным распределением ВНВ, которые выделяются из плазмы крови двойным ультрацентрифугированием при $110\,000 \text{ g}$, поскольку такой способ – “стандарт” для выделения ВНВ из плазмы крови [11].

Было установлено, что ДПС, позволяющие получать фракцию частиц с размерными характеристиками, наиболее приближенными к “стандарту” (рис. 9), соответствуют массовым соотношениям ПЭГ:декстран, относящимся к области вблизи бинодали, но лежащей ниже нее. В таких условиях четкого разделения на две фазы в плазме не происходит: оба полимера, растворяясь в плазме при перемешивании и взаимодействуя с ее компонентами, перемещаются в верхнюю часть раствора (верхняя фаза), а тяжелые везикулы концентрируются в нижней фазе системы “плаз-

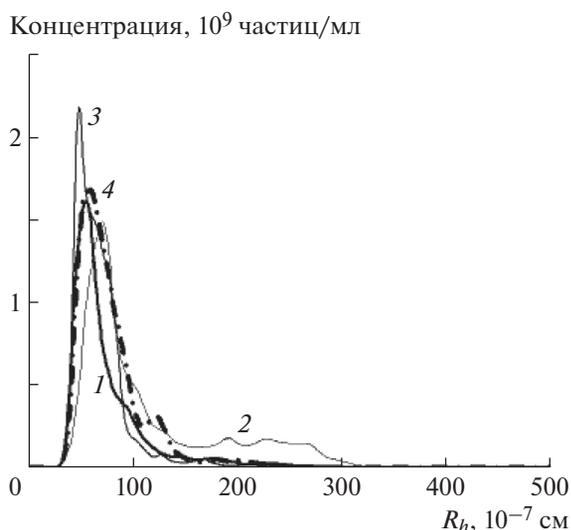


Рис. 9. Распределения частиц по размерам в нижней фазе системы “плазма–ДПС” для ДПС с номерами 66 (1), 59 (2), 60 (3) (табл. 2), полученные методом АТН, и для везикул, выделенных из плазмы ультрацентрифугированием при 110 000 г (4).

ма–ДПС” для высокомолекулярных образцов. Чем выше была ММ полимеров ДПС, тем при более низких их концентрациях происходило выделение ВНВ.

ДПС-66 (табл. 2), составленная из декстрана с $M_w = 470 \times 10^3$ г/моль и ПЭГ с $M_w = 19.4 \times 10^3$ г/моль при массовом процентном соотношении декстран:ПЭГ = 3.5:1 была отобрана как оптимальная. Основной причиной выделения ДПС-66 среди других было то, что она позволяла получать унимодальные распределения везикул, соответствующие “стандарту”, и высокие концентрации ВНВ нужных размеров, также близкие к “стан-

дарту” и даже выше. Кроме того, в сравнении, например, с ДПС-60 (рис. 9) она требовала минимального количества полимеров для достижения цели. ДПС-66 использовали для анализа взаимодействия полимеров ДПС с компонентами плазмы.

В процессе оптимизации ДПС выявили зависимость размера выделяемых везикул от соотношения гидродинамических объемов молекул полимеров ДПС. Значение гидродинамического объема оценивали как $V_h = (4/3)\pi R_h^3$. Для оптимальной системы ДПС-66 и близких к ней по качеству систем для выделения ВНВ со средним гидродинамическим радиусом $R_h \sim 50 \times 10^{-7}$ см отношение $(V_{h\text{дек}}/V_{h\text{ПЭГ}}) = 24 \pm 4$. Характерной особенностью ДПС при таком соотношении гидродинамических объемов молекул декстрана и ПЭГ было то, что получаемые распределения частиц в нижней фазе системы “ДПС–плазма” соответствовали унимодальным фракциям частиц аналогично тому, как это показано на рис. 9 для ДПС-66.

Механизм взаимодействия ДПС с компонентами плазмы исследовали с помощью модельных систем методом ДРС в растворах в ФСБ. В качестве модельного белка плазмы был взят альбумин, так как доля альбуминов от общего числа белков в плазме составляет 60%, т.е. альбумин – типичный белок плазмы крови. Использовали бычий сывороточный альбумин (БСА). Схема проведения эксперимента следующая: смешивали заранее приготовленные растворы ПЭГ 4.6% и БСА 10.4% в ФСБ и фиксировали распределения частиц как результат их взаимодействия. Это исследование показывает возрастание доли частиц с размером, превышающим молекулярный размер БСА и ПЭГ при повышении концентрации ПЭГ в совместном растворе, и однозначно свидетельствует о комплексообразовании между компонентами

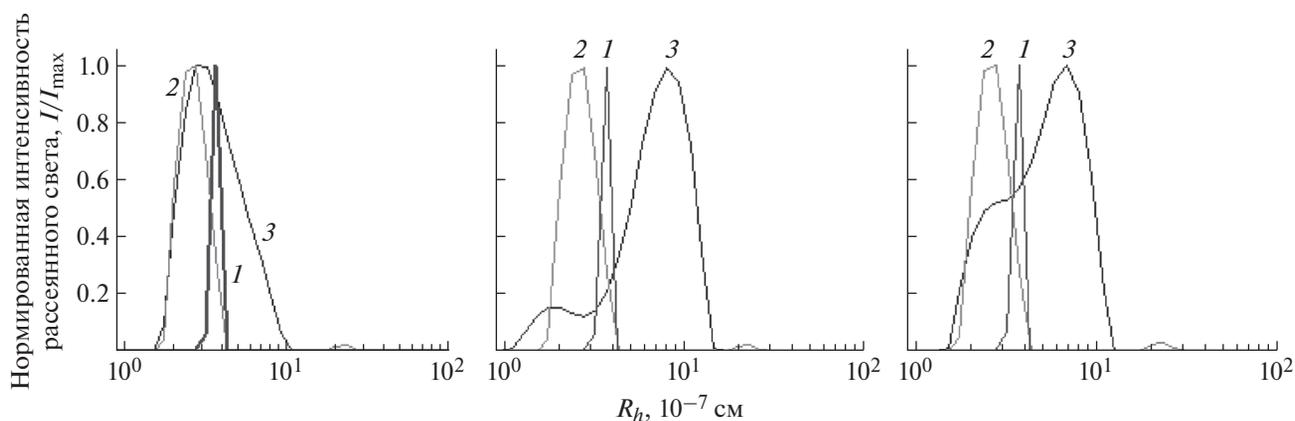


Рис. 10. Нормированные распределения частиц по размерам в растворе модельной системы “ПЭГ-5–БСА” при последовательном увеличении концентрации полимера 0.46 (а), 1.38 (б), 2.3 мас. % (в) и постоянной концентрации альбумина (БСА) 5.2 мас. %.

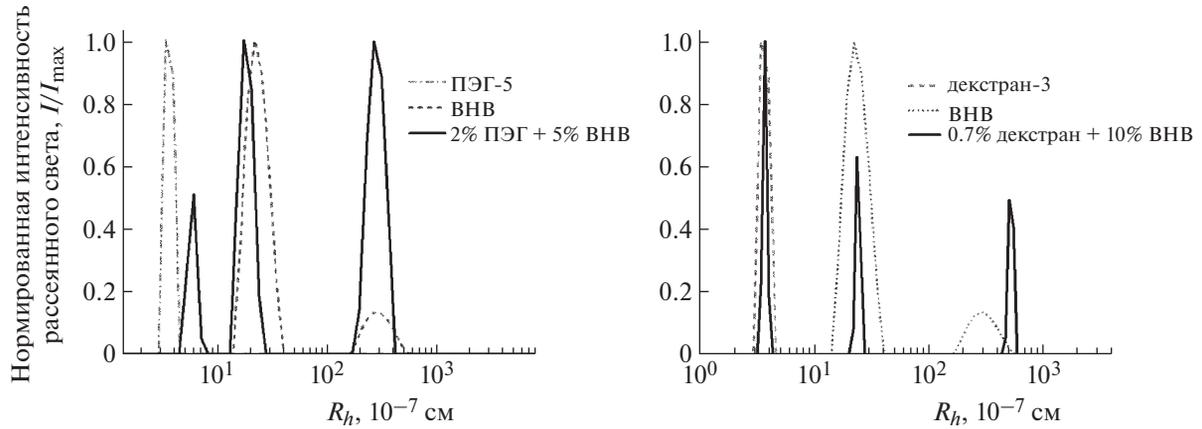


Рис. 11. Распределения частиц по размерам в растворах исходных компонентов и их смесей в ФСБ при 298 К: а – смесь ПЭГ-5 и ВНВ, б – смесь декстрана-3 и ВНВ. Распределения получены при угле рассеяния 90° .

(рис. 10). Наличие подобного комплексообразования между ПЭГ и белками хорошо известно [35, 36]. Декстран в отличие от ПЭГ не проявил склонности к комплексообразованию с БСА.

Изучение взаимодействия ПЭГ с ВНВ (рис. 11а), а также декстрана с ВНВ (рис. 11б) по аналогичной модельной схеме показало отсутствие комплексообразования между ВНВ и полимерами, о чем свидетельствовало сохранение размеров частиц в совместном растворе.

Таким образом, на модельных системах установлена инертность полимеров используемой ДПС к ВНВ и показано отсутствие взаимодействия между декстраном и белками плазмы, а также наличие комплексообразования между белками плазмы и ПЭГ. Этот результат позволил прийти к общему выводу о возможности использования ДПС “ПЭГ–декстран” для эффективного выделения внеклеточных везикул со средним гидродинами-

ческим радиусом $R_h = 50 \times 10^{-7}$ см. Наличие везикул в нижней фазе системы “плазма–ДПС” было подтверждено методом крио-ПЭМ (рис. 12).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен надежный и относительно недорогой метод выделения внеклеточных нановезикул из плазмы крови с использованием двойной полимерной системы “ПЭГ–декстран”. Высокая концентрация выделяемых этим методом ВНВ обусловлена разделением компонентов плазмы за счет использования неравновесных условий близости к бинадали ДПС, инертностью везикул к обоим полимерам, а также эффективным связыванием белковых компонентов плазмы только с одним из полимеров ДПС – ПЭГ. Оптимальной для выделения ВНВ оказалась ДПС, состоящая из декстрана-3 с ММ 470×10^3 г/моль и ПЭГ-5 с ММ 17×10^3 г/моль (табл. 1) при их массовом процентном соотношении 3.5:1. При такой концентрации полимеров состав данной ДПС относится к области, лежащей ниже бинадали ее фазовой диаграммы. Средний гидродинамический радиус R_h выделяемых с использованием данной ДПС нановезикул составляет 50×10^{-7} см. Это частицы гораздо более крупного размера, чем молекулы ПЭГ и декстрана (табл. 1). Увеличением содержания декстрана в составе оптимальной ДПС можно смещать максимум распределения в сторону уменьшения средних размеров ВНВ аналогично тому, как это показано на рис. 11. Однако определяющее влияние на средний размер и ширину распределения выделяемых ВНВ, как показал эксперимент, оказывает соотношение гидродинамических объемов молекул декстрана и ПЭГ в плазме, а значит, молекулярная масса полимеров. Двукратное применение оптимальной ДПС для

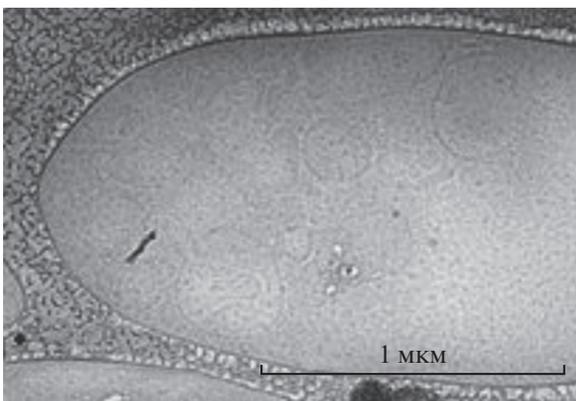


Рис. 12. Крио-ПЭМ-изображение везикул, выделенных с помощью ДПС “ПЭГ–декстран”, полученное на медной сетке с углеродным напылением TEM-UC200CU25.

выделения везикул из 1 см³ плазмы позволяет добиться практически полного отсутствия белков в нижней фазе системы “плазма–ДПС” и содержания в ней ВНВ ~2 × 10¹¹ частиц/мл (по данным АТН). Такую концентрацию можно считать высокой в сравнении со стандартом выделения ВНВ методом двойного ультрацентрифугирования при 110000 g, в процессе которого часть везикул теряется из-за разрушения их липидных оболочек [11]. Количество ВНВ, которое можно выделить с помощью ДПС “ПЭГ–декстран” из 1 см³ плазмы, достаточно для дальнейшего анализа состава их поверхностных белков, что было продемонстрировано в [37].

М.А. Слюсаренко выражает благодарность сотруднице НМИЦ онкологии им. Петрова Е.Л. Зейдиной за рекомендации и полезные советы.

Работа выполнена при поддержке “Центра развития молекулярных и клеточных технологий”, где были получены микрофотографии методом крио-ПЭМ, и “Центра диагностики функциональных материалов для медицины, фармакологии и нанoeлектроники”, на оборудовании которого были выполнены исследования методами статического, динамического рассеяния света и денситометрии, Санкт-Петербургского государственного университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Albertsson P.A.* // *Biochem. Pharmacol.* 1961. V. 5. P. 351. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90028-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90028-4)
2. *Platis D., Labrou N.E.* // *Biotechnol. J.* 2009. V. 4 (9). P. 1320. <https://doi.org/10.1002/biot.200800359>
3. *Andrews B.A., Huang R.B., Asenjo J.A.* // *Bioseparation.* 1995. V. 5 (2). P. 105. PMID: 7772946
4. *Asenjo J.A., Andrews B.A.* // *J. Chromatogr. A.* 2012. V. 1238. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.049>
5. *Yáñez-Mó M., Siljander P.R.-M., Andreu Z. et al.* // *J. Extracell. Vesicles.* 2015. V. 4. P. 27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
6. *Doyle L.M., Wang M.Z.* // *Cells.* 2019. V. 8 (7) P. 727. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>
7. *Bebelman M.P., Smit M.J., Pegtel D.M. et al.* // *Pharmacol. Ther.* 2018. V. 188. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.02.013>
8. *Abels E.R., Breakefield X.O.* // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2016. V. 36 (3). P. 301. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z>
9. *Chernyshev V.S., Chuprov-Netochin R.N., Tsydenzhapova E. et al.* // *J. Extracell. Vesicles.* 2022. V. 11 (8). e12256. <https://doi.org/10.1002/jev2.12256>
10. *Visan K.S., Lobb R.J., Ham S. et al.* // *J. Extracell. Vesicles.* 2022. V. 11 (8). e12266. <https://doi.org/10.1002/jev2.12266>
11. *Yang D., Zhang W., Zhang H. et al.* // *Theranostics.* 2020 V. 10 (8). P. 3684. <https://doi.org/10.7150/thno.41580>
12. *Johansson H.O., Persson J., Tjerneld F.* // *Biotechnol. Bioeng.* 1999. V. 66 (4). P. 247. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(1999\)66:4<247::AID-BIT6>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(1999)66:4<247::AID-BIT6>3.0.CO;2-5)
13. *Andrews B.A., Schmidt A.S., Asenjo J.A.* // *Biotechnol. Bioeng.* 2005. V. 90 (3). P. 380. <https://doi.org/10.1002/bit.20495>
14. *Jadhav S.B., Singhal R.S.* // *Carbohydrate Polymers.* 2012. V. 90 (4). P. 1811. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.078>
15. *Schärtl W.* *Light scattering from polymer solutions and nanoparticle dispersions.* Berlin-Heidelberg: Springer, 2007. 191 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-71951-9>
16. *Chu B.* *Laser Light Scattering: Basic Principles and Practice,* 2nd Ed. New York: Academic Press, 1991. 343 p.
17. *Fedosov I.V., Nefedov I.S., Khlebtsov B.N. et al.* // *Opt. Spectrosc.* 2009. V. 107. Art. 846. <https://doi.org/10.1134/S0030400X09120030>
18. DYNALS software. <https://www.photocor.ru/products/dynals>
19. Nanosight NTA 3.2 Software. <https://www.malvernpanalytical.com/en/assets/NanoSight-NTA32-SUN-Software>
20. *Kulicke W.M., Clasen C.* *Viscosimetry of Polymers and Polyelectrolytes.* Springer Laboratory Series. Berlin, Heidelberg: Springer, 2004. 120 p. https://doi.org/10.1007/978-3-662-10796-6_9
21. *Armstrong J.K., Wenby R.B., Meiselman H.J. et al.* // *Biophys. J.* 2004. V. 87 (6). P. 4259. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.047746>
22. *Burchard W.* // *Adv. Colloid Interface Sci.* 1996. V. 64. P. 45. [https://doi.org/10.1016/0001-8686\(95\)00274-X](https://doi.org/10.1016/0001-8686(95)00274-X)
23. *de Belder A.N.* *Dextran - handbook: Physical-chemical properties.* Uppsala: Amersham Biosciences, 2003. 64 p. <https://www.dextran.com/>
24. *Seiffert S.* *Physical Chemistry of Polymers: A Conceptual Introduction,* Berlin; Boston: De Gruyter, 2020. 215p. <https://doi.org/10.1515/9783110672817>
25. *Gray H.B., Bloomfield V.A., Hearst J.E.* // *J. Chem. Phys.* 1967. V. 46 (4). P. 1493. <https://doi.org/10.1063/1.1840879>
26. *Huber A.* // *J. Appl. Polym. Sci. Appl. Polym. Symp.* 1991. V. 48. P. 95. <https://doi.org/10.1002/APP.1991.070480009>
27. *Pavlov G.M., Korneeva E.V., Yevlampieva N.P.* // *Intern. J. Biol. Macromol.* 1994. V. 16 (6). P. 318. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(94\)90063-9](https://doi.org/10.1016/0141-8130(94)90063-9)
28. *Pavlov G.M., Grishchenko A.E., Rjuntsev E.I., Yevlampieva N.P.* // *Carbohydrate Polymers* 1999. V. 38 P. 267. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00101-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00101-5)

29. *Цветков В.Н.* Жесткоцепные полимерные молекулы. Л.: Наука, 1986, 378 с.
30. *Grube M., Cinar G., Schubert U.S., Nischang I.* // *Polymers*. 2020. V. 12. 277.
<https://doi.org/10.3390/polym12020277>
31. *Shpyrkov A.A., Tarasenko I.I. Pankova G.A. et al.* // *Polym. Sci. A*. 2009. V. 51 (3). P. 250.
<https://doi.org/10.1134/S0965545X09030031>
32. *Pavlov G.M., Koreeva E.V., Harding S.E. et al.* // *Carbohydrate Polymers*. 1999. V. 38 (4). P. 195.
33. *Pavlov G.M.* // *Eur. Phys. J. E*. 2007. V. 22. P. 171.
<https://doi.org/10.1140/epje/e2007-00025-x>
34. *Pavlov G.M., Okatova O.V., Gubarev A.S. et al.* // *Polym. Sci. A*. 2015. V. 57 (3). P. 115.
<https://doi.org/10.1134/S0965545X15020133>
35. *Bekale L., Agudelo D., Tajmir-Riahi H.A.* // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015. V. 130. P. 141.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.03.045>
36. *Ragi C., Sedaghat-Herati M.R., Ouameur A.A. et al.* // *Biopolymers*. 2005. V. 78 (5). P. 231.
<https://doi.org/10.1002/bip.20281>
37. *Slyusarenko M., Shalaev S., Valitova A. et al.* // *Biosensors*. 2022. V. 12 (1). 23.
<https://doi.org/10.3390/bios12010023>