

Hệ chuyển gen vi bọt kết hợp siêu âm: Một chiến lược hiệu quả và an toàn

Trần Thị Anh Thơ¹, Dương Thị Hồng Nhung²
Nguyễn Xuân Bắc², Nguyễn Văn Rư², Nguyễn Thị Lập^{2*}
¹ Khoa Dược, Trường Đại học Y khoa Vinh
² Trường Đại học Dược Hà Nội

Summary

Gene therapies are expected to be promising therapeutic strategies for intractable diseases such as cancers as well as genetic and inflammatory diseases. However, its use in clinical applications requires the efficient delivery of nucleic acids to target tissues, which is a major challenge. In particular, for RNAi - based gene therapies, it is important to avoid degradation by nuclease and their rapid removal from circulation. The development of theranostic (a term for combining therapeutics and diagnostics) nanoparticles has gained attention. A combination of ultrasound exposure and microbubbles further increases cell membrane permeability, leading to enhanced gene uptake. Furthermore, ultrasound - mediated nucleic acid delivery could be performed only in ultrasound exposed areas. This article summarizes the components and structure of ultrasound - mediated nucleic acid systemic delivery system, using microbubbles, and discusses its mechanism by which ultrasound enhances gene delivery.

Keywords: Gene delivery, microbubbles, non - viral vectors, targeted gene therapy, ultrasound.

Đặt vấn đề

Trị liệu gen được kỳ vọng là chiến lược điều trị hiệu quả cho các bệnh khó chữa như ung thư, di truyền và viêm nhiễm. Trong những năm gần đây, số lượng trị liệu gen hướng đích được ứng dụng rộng rãi hơn với cả các bệnh gia tăng do quá trình lão hóa như thoái hóa thần kinh, tim mạch. Yếu tố chính trong sự phát triển của trị liệu gen là cần có hệ vận chuyển acid nucleic hướng đích một cách an toàn và hiệu quả. Đặc biệt, với các trị liệu gen dựa trên RNAi, cần hệ vận chuyển giúp tránh bị phân hủy bởi nuclease và sớm bị loại khỏi hệ tuần hoàn.

Gần đây, sự phát triển hệ vi bọt trong lĩnh vực “theranostic” (thuật ngữ chỉ sự kết hợp phương pháp điều trị và chẩn đoán) đã gây được sự chú ý lớn với các nhà khoa học. Trong siêu âm, vi bọt là yếu tố cản quang thường được sử dụng kết hợp với siêu âm để cải thiện độ phân giải và độ nhạy của hình ảnh. Sự kết hợp của các vi bọt với siêu âm không chỉ giúp cho việc vận chuyển acid nucleic mà còn

nhận biết, theo dõi và chẩn đoán được bằng hình ảnh siêu âm. Phương pháp trị liệu gen này đã được nhiều nghiên cứu chứng minh không những thuận tiện mà còn không xâm lấn, an toàn. Có thể nói hệ vi bọt kết hợp siêu âm là dạng bào chế có nhiều triển vọng ứng dụng trong trị liệu gen. Do vậy, bài báo này nhằm mục đích tìm hiểu và phân tích về thành phần cấu trúc, cơ chế tăng cường hiệu quả chuyển gen của hệ vi bọt kết hợp siêu âm ứng dụng trong trị liệu gen.

Thành phần và cấu trúc của vi bọt

Thành phần

Hầu hết các vi bọt sử dụng trong y sinh có đường kính trong khoảng 0,5 - 10 μm (giới hạn trên cho việc đi qua các mao mạch phổi). Vi bọt có 2 thành phần chính là lõi khí và lớp vỏ bao bên ngoài (hình 1). Lõi khí gồm một hoặc hỗn hợp các chất khí. Sự kết hợp các loại khí thường được sử dụng vì hai lý do, thứ nhất là tạo ra sự chênh lệch về áp suất riêng phần và thứ hai là để tạo ra áp suất thẩm thấu khí làm ổn định các vi bọt. Trong trường hợp kết hợp của các khí, một khí được gọi là chất điều chỉnh khí sơ cấp hay khí đầu tiên. Khí thứ hai được gọi là chất khí thẩm thấu. Khí có tính thẩm thấu qua bề mặt vi bọt thấp hơn được gọi là chất khí thẩm thấu. Chất khí thẩm thấu hay khí thứ hai là chất khí

Chịu trách nhiệm: Nguyễn Thị Lập

Email: lapnt@hup.edu.vn

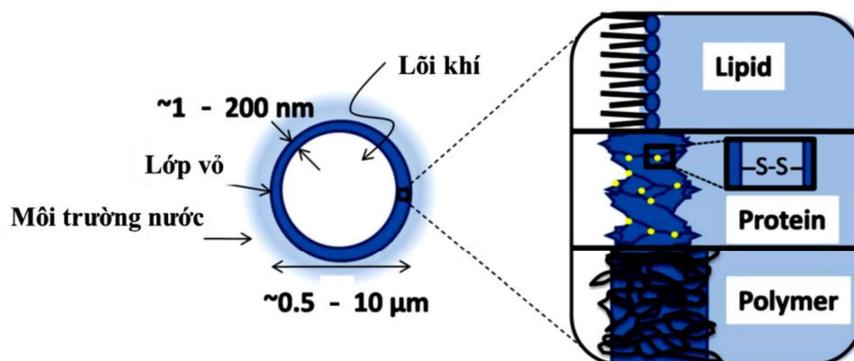
Ngày nhận: 09/4/2021

Ngày phản biện: 12/4/2021

Ngày duyệt bài: 20/5/2021

ở nhiệt độ phòng hoặc là chất lỏng, miễn là có áp suất riêng phần hoặc áp suất hơi đủ ở nhiệt độ sử dụng để mang lại hiệu quả thẩm thấu mong muốn. Các công thức cấu tạo vi bọt ban đầu sử dụng pha khí là không khí (hỗn hợp oxy và nitơ), tuy nhiên, dạng vi bọt này chỉ tồn tại trong tuần hoàn chưa đến một phút. Sau đó, các

loại khí trơ, không hòa tan như perfluorocarbon C3F8 (perflutren), C4F10 (perflubutane), C5F12 (perflenapent) và C6F14 (perflexane) đã được nghiên cứu cho thấy khả năng kéo dài thời gian tuần hoàn trong máu của vi bọt, điều này đã tạo sức đẩy rất quan trọng cho việc ứng dụng vi bọt trong các nghiên cứu tiếp theo [15].



Hình 1. Thành phần và cấu trúc của vi bọt

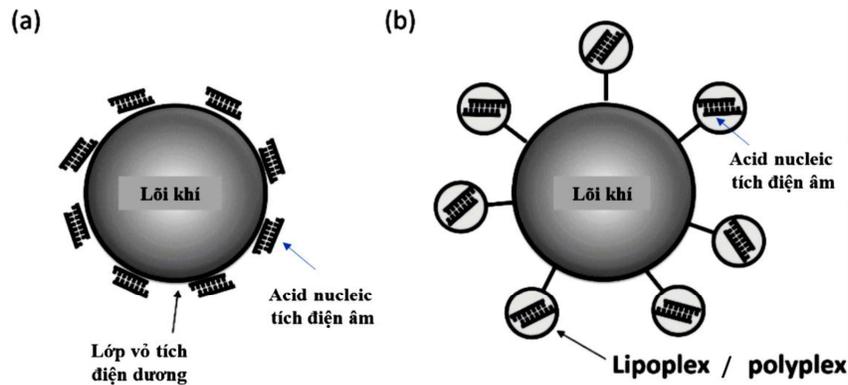
Thành phần thứ 2 của vi bọt là lớp vỏ bao quanh lõi khí, giống như một rào cản giữa lõi khí và môi trường thân nước xung quanh. Sự khuếch tán khí ra ngoài vi bọt và các tính chất cơ học của vi bọt phụ thuộc vào bản chất của lớp vỏ này. Lớp vỏ vi bọt còn đóng vai trò quan trọng trong việc vận chuyển các phân tử thuốc và acid nucleic. Nếu độ đàn hồi của nguyên liệu cấu tạo vỏ tăng, năng lượng âm mà nó có thể chịu được trước khi nở to hoặc vỡ sẽ tăng, từ đó tăng thời gian ổn định của vi bọt. Các vật liệu vỏ khác nhau có thể được sử dụng, phổ biến là lipid, protein hoặc polymer, độ dày của lớp vỏ trong khoảng từ 1 - 200 nm). Các các phân tử lipid được sắp xếp với nhau thông qua các tương tác vật lý, như các tương tác kỵ nước và van der Waals. Lớp vỏ protein được hình thành bằng các liên kết chéo của các liên kết disulfid. Lớp vỏ polymer được hình thành bởi liên kết chéo hoặc quấn vào nhau của các chuỗi polymer (hình 1) [1, 16].

Vật liệu vỏ sử dụng phổ biến nhất trong hệ vận chuyển gen là lipid (thành phần chính là phospholipid), do có tính tương thích sinh học và độ an toàn cao [15]. Các vi bọt có lớp vỏ cấu tạo lipid là một trong những dạng bào chế phổ biến nhất được sử dụng chẩn đoán và điều trị. Lớp vỏ lipid có một số ưu điểm. Thứ nhất, phospholipid có khả năng tự lắp ráp một cách tự nhiên, tạo thành một lớp có tính định hướng cao

tại bề mặt tiếp xúc giữa nước và không khí, các chuỗi acyl kỵ nước sẽ tiếp xúc với pha khí và các nhóm ưa nước tiếp xúc với pha nước. Do đó, lớp lipid sẽ hình thành một cách tự nhiên xung quanh một bong bóng khí. Bên cạnh đó, sức căng bề mặt thấp đạt được bởi lớp vỏ lipid sẽ giúp vi bọt ổn định hơn. Ngoài ra, lớp vỏ lipid có tính liên kết cao do tương tác kỵ nước và van der Waals giữa các chuỗi acyl giúp cho vi bọt được đóng gói chặt chẽ. Tính kết dính cao tạo cho lớp vỏ lipid có đặc tính rắn chắc [10]. Những cơ chế này giúp vi bọt cấu tạo bởi màng lipid ổn định hơn, mà không phụ thuộc vào sự hình thành cầu nối disulfid như màng protein. Hơn nữa, các phân tử lipid được liên kết với nhau bằng tương tác vật lý "yếu", không bền vững như kiểu dạng liên kết chéo hoặc quấn vào nhau như vỏ polymer, làm cho lớp vỏ có thể dễ dàng mở rộng và nén lại trong quá trình kết hợp với siêu âm nhằm tăng tính thấm qua màng tế bào, giúp tăng hiệu quả chuyển gen. Vi bọt được làm từ màng lipid có thể dễ dàng đảm nhiệm thêm được chức năng vận chuyển gen hướng đích, như gắn với các phối tử hay vận chuyển acid nucleic để tăng hiệu quả chẩn đoán và điều trị [18, 20].

Vi bọt kết hợp với acid nucleic

Các vi bọt có lớp vỏ tích điện dương có thể tạo phức hợp trực tiếp với acid nucleic tự do tích điện âm bằng tương tác tĩnh điện (hình 2a) [7].



Hình 2. Cấu trúc phức hợp vi bọt với acid nucleic tự do (a) hoặc với lipoplex/polyplex (b)

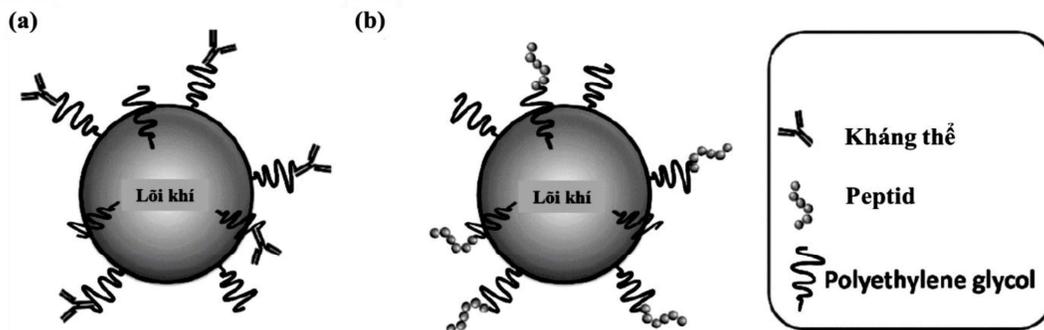
Đây là một phương pháp đơn giản có thể phù hợp với nhiều loại phân tử acid nucleic như pDNA, siRNA và miRNA. Việc tải các acid nucleic lên bề mặt của các vi bọt có chứa lipid tích điện dương có thể làm tăng tính ổn định của acid nucleic và tăng hiệu quả chuyển gen khi có mặt trong huyết thanh [3-5].

Một số nghiên cứu khác tạo ra hệ chuyển gen gồm các vi bọt có thể tải các phức hợp acid nucleic-liposome (lipoplex) hoặc acid nucleic - phức hợp polymer (polyplex) (hình 2b) [11, 16]. Việc sử dụng lipoplex hoặc polyplex có thể làm tăng khối lượng tải acid nucleic lên các vi bọt. Các chiến lược này giúp giải phóng phức hợp từ các vi bọt do tiếp xúc với sóng siêu âm có thể làm tăng thêm hiệu quả chuyển gen hơn so với các phương pháp giải phóng acid nucleic tự do. Các dạng bào chế này thường sử dụng PEG được gắn kết với biotin để tải các phức hợp lên các vi bọt thông qua tương tác avidin - biotin [12, 14, 21].

Có giả thuyết cho rằng các acid nucleic có thể bị phân hủy bởi lực vật lý của sóng siêu âm sử dụng để chuyển gen. Kết quả nghiên cứu đã xác nhận không có tổn thương nào đối với siRNA khi tiếp xúc với siêu âm và sóng siêu âm không làm cho chuỗi RNA tổng số bị phân hủy [17]. Tuy nhiên, cần có những nghiên cứu khác xem xét ảnh hưởng của siêu âm đối với acid nucleic tùy thuộc vào cường độ của sóng siêu âm và loại phân tử.

Vi bọt liên hợp với phối tử đặc hiệu cho chuyển gen hướng đích

Để hệ vi bọt kết hợp siêu âm có khả năng vận chuyển và giải phóng đúng đích tác dụng chứ không phải ở tế bào và mô thường, trên bề mặt vi bọt thường liên hợp với các phối tử có tính đặc hiệu với mô đích. Điều này giúp tăng cường không chỉ hiệu ứng hình ảnh mà còn cả hiệu quả chuyển gen. Một số loại phối tử phổ biến đã được sử dụng liên hợp với các vi bọt như các kháng thể, peptid và vitamin.



Hình 3. Cấu trúc vi bọt liên hợp với các phối tử như kháng thể (a) hay peptid (b) thông qua cầu nối polyethylene glycol (PEG)

Kháng thể đặc hiệu mô là phối tử thường được sử dụng liên hợp với vi bọt thông qua cầu nối polyethylen glycol (PEG) (hình 3 a). Ví dụ, vi bọt hướng đích sử dụng kháng thể kháng phân tử kết dính tế bào-niêm mạc 1 (MAdCAM-1) hoặc phân tử kết dính mạch-1 (VCAM-1) cho thấy có hiệu quả trong hình ảnh siêu âm và liệu pháp gen trong bệnh Crohn [18]. Tương tự, kháng thể CD105 (endoglin) sử dụng trong hệ vi bọt chuyển gen kháng lại sự hình thành mạch máu trong điều trị ung thư hay kháng thể protein-2 liên kết vi ống (MAP-2) có thể nâng cao hiệu quả điều trị tổn thương tủy sống [22].

Vì vậy, các vi bọt phối hợp với kháng thể đã được đánh giá khá tốt do có ái lực cao với các vị trí đích. Để tạo các vi bọt gắn kết với các kháng thể, thường sử dụng tương tác avidin - biotin. Tuy nhiên, avidin vẫn còn là một thách thức do có khả năng sinh miễn dịch ở người [13]. Do đó, cần phải có các phương pháp mới gắn kết kháng thể với vi bọt để phù hợp ứng dụng trong lâm sàng.

Bên cạnh việc sử dụng kháng thể, peptid là những phân tử nhỏ hơn, có tính ổn định hóa học và tính sinh miễn dịch thấp. Peptid liên kết đặc hiệu với các vị trí đích đã được nghiên cứu và gắn kết với vi bọt thông qua cầu nối PEG (hình 3b). Liên quan đến việc tạo các vi bọt hướng đích, một số nghiên cứu cho thấy khả năng sử dụng của các peptid liên kết đặc hiệu với thụ thể tế bào gan sản xuất erythropoietin A2 (EphA2) trên tế bào khối u, thụ thể yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu 2 (VEGFR2) của nội mô khối u, hoặc integrin $\alpha\beta3$ của tế bào nội mô [14, 20].

Acid folic (vitamin B9) cũng là một phối tử được liên hợp với hệ vi bọt chuyển gen hướng đích. Kết quả một nghiên cứu cho thấy hệ vi bọt kết hợp siêu âm đã chuyển gen chỉ thị mã hóa tạo luciferase gắn acid folic, hệ này có khả năng chuyển và biểu hiện gen cao, hướng đích u não [6].

Ngoài ra, một số loại protein và đường, như transferrin và mannose, cũng được sử dụng làm phối tử gắn kết với các vi bọt [2, 21].

Cơ chế chuyển gen của hệ vi bọt kết hợp siêu âm

Siêu âm làm tăng tính thấm của màng tế bào và tạo điều kiện thuận lợi cho việc chuyển thuốc hoặc gen vào tế bào. Sự kết hợp giữa siêu âm và vi bọt giúp tăng cường hơn tính thấm qua màng tế bào ngay cả khi sử dụng sóng siêu âm cường độ yếu, dẫn đến tăng cường sự hấp thu

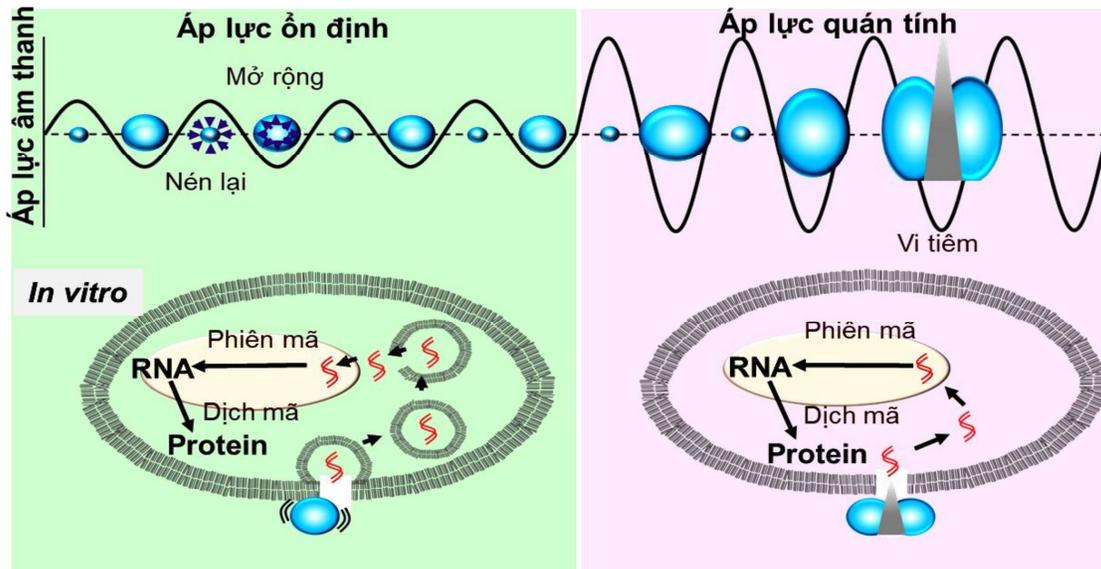
thuốc và gen [9].

Tính chất của vi bọt kết hợp với siêu âm chủ yếu phụ thuộc vào áp suất âm thanh. Ở áp lực âm thanh ổn định, các vi bọt sẽ gây ra dao động tuyến tính và tần số phản xạ bằng tần số truyền đi. Sự gia tăng của áp suất âm dưới ngưỡng của áp lực quán tính, gây ra sự giãn nở và nén của các vi bọt. Ngoài ra, các vi bọt dao động tạo ra vi dòng ổn định và lực cắt lớn. Áp suất âm thanh cao hơn dẫn đến hiện tượng áp lực quán tính, trong đó dao động của các vi bọt ngày càng trở nên mạnh mẽ và có thể phá vỡ vi bọt (xẹp lại). Áp lực quán tính này gây ra các sóng xung kích và sóng vi mô xung quanh vi bọt, vận tốc cực đại có thể lên đến 700 m/s [1].

Khả năng tăng tính thấm màng tế bào và mạch máu của các vi bọt kết hợp siêu âm được phát triển như một hệ vận chuyển gen không xâm lấn mô. Phương pháp này liên quan đến việc gắn gen vào vi bọt, sau đó được lưu thông qua không gian nội mạch và bị phá hủy cơ học bởi sóng siêu âm tại mô đích. Tận dụng nồng độ cao tại chỗ của các chất điều trị và khả năng tăng tính thấm mao mạch tạm thời, có thể được sử dụng để điều trị các khối u.

Cơ chế tăng hiệu quả chuyển gen qua màng tế bào

Tương tác cơ học giữa các tế bào trên mô hình *in vitro*, các vi bọt và siêu âm có liên quan đến áp lực âm thanh và các thông số siêu âm khác (hình 4). Ở áp lực âm thanh thấp, các dao động của vi bọt trong vùng áp lực ổn định gần màng tế bào có thể tạo ra các dòng chảy và lực cắt để làm vỡ màng bao gồm các hiện tượng đẩy và kéo trên màng tế bào, tăng tạo thành thể nội bào khi có mặt các vi bọt và tạo điều kiện cho việc chuyển gen, quá trình này không gây ra bất kỳ tổn thương nào cho tế bào [12]. Ở áp lực âm thanh cao, hiện tượng vi tiêm xảy ra ở áp lực quán tính có thể tạo ra các lỗ hổng tạm thời trên màng tế bào. Áp lực quán tính từ vi tiêm làm tăng tính thấm tạm thời qua màng tế bào, cho phép acid nucleic trong tuần hoàn tiếp cận trực tiếp với tế bào chất của tế bào, sự hình thành thể nội bào rất khó khăn do màng tế bào bị tổn thương. Sự hình thành lỗ hổng nhờ vi bọt là biện pháp hiệu quả để mở tạm thời màng tế bào, tạo điều kiện cho vận chuyển thuốc/gen vào trong tế bào. Tuy nhiên, quá trình này có thể gây tổn thương cơ học trực tiếp cho tế bào hoặc gây mất ion calci ngoại bào.



Hình 4. Cơ chế chuyển gen qua màng tế bào

Bên cạnh đó, vận chuyển gen bởi vectơ không phải virus cần vượt qua nhiều rào cản ngoại bào và nội bào như: 1) sự bám dính trên bề mặt tế bào, 2) xâm nhập tế bào, 3) thoát khỏi thể nội bào, 4) giải phóng acid nucleic tại vị trí đích tác dụng. Sau khi acid nucleic được đưa vào trong nhân của tế bào sẽ trải qua quá trình phiên và dịch mã, tạo thành protein.

Cơ chế tăng hiệu quả chuyển gen qua mạch máu

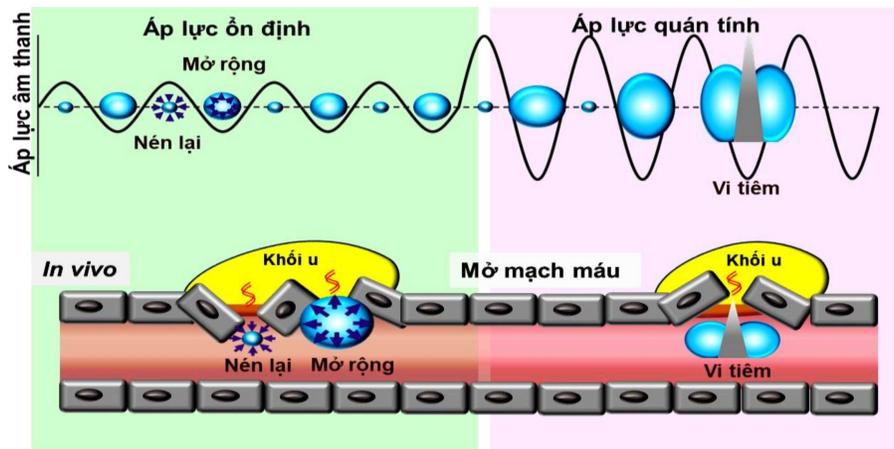
Việc cải thiện sự chuyển gen đến mô ngoài mạch máu có thể được thực hiện bằng cách thay đổi tính toàn vẹn của mạch máu (hình 5). Tại vùng áp lực âm thanh ổn định do áp suất âm thanh thấp hơn gây ra, acid nucleic thoát mạch vào mô điều trị bằng cách thay đổi cấu trúc trong mạch máu với sự dao động vi bọt gần các tế bào nội mô mạch máu. Dưới sự kích hoạt bởi siêu âm, vi bọt có thể giãn nở và nén lại để làm biến dạng thành mạch máu, như “xoá bóp”, tạo ra các điểm nối khoảng trống nội bào làm tăng tính thấm và cho phép acid nucleic trong hệ tuần hoàn thoát mạch vào mô điều trị. Không có xuất huyết đáng kể trong mạch máu trong trường hợp này [6, 8].

Ở áp lực âm thanh cao, áp lực quán tính hình thành có thể phá vỡ tính toàn vẹn của nội mô mạch máu, làm tăng tính thấm qua mạch đối với acid nucleic trong tuần hoàn. Sử dụng

áp lực âm thanh cao hơn ngưỡng tạo áp lực quán tính, các vi bọt mạch máu ở dạng vi tiêm (microjet) sẽ dễ bị nổ có thể gây ra sự gián đoạn và rò rỉ mạch máu tạm thời, cho phép vận chuyển đại phân tử xuyên mạch giữa các tế bào, kích thích sự xâm nhập nội bào. Quá trình này là một phương pháp hiệu quả cao trong trị liệu gen, nhưng có liên quan đến tổn thương mạch máu và xuất huyết [8].

Do vậy, một số nghiên cứu sử dụng phương pháp chủ động hướng đích tế bào ung thư bằng cách kết hợp vi bọt với siêu âm tập trung (focused ultrasound (FUS)), tức là chỉ tập trung sóng siêu âm tần số cao tại vị trí khối u mà không tại các mô lành. Ngoài việc bắn acid nucleic vào đúng vị trí cần thiết, phương pháp này còn giúp thuốc thấm sâu hơn vào các mô do sóng siêu âm làm mờ và tạo lỗ hồng thành mạch máu bao xung quanh khối u (hình 5).

Đáng chú ý, tần số cộng hưởng siêu âm cao khi kết hợp với siêu âm tập trung có khả năng mờ tạm thời hàng rào máu não trong vài giờ, giúp giải phóng thuốc, tăng khả năng thấm và lưu giữ tại mô u não. Việc phá vỡ hàng rào này giúp mở ra bước đột phá mới trong điều trị u não, tạo đà phát triển cho việc sử dụng sóng siêu âm tập trung để chuyển gen bằng phương pháp không xâm lấn đối với bệnh u não và một số chứng rối loạn não [19, 8].



Hình 5. Cơ chế chuyển gen qua mạch máu

Ưu điểm của hệ vi bọt kết hợp siêu âm áp dụng trong chuyển gen

Có thể thấy, sử dụng hệ vi bọt kết hợp siêu âm để chuyển gen có nhiều ưu điểm nổi bật. Đầu tiên, vi bọt kết hợp với siêu âm đã được sử dụng nhiều trong chẩn đoán y học (chẩn đoán hình ảnh) với độ an toàn cao trong thử nghiệm lâm sàng, thể hiện rõ qua việc vi bọt được FDA phê duyệt sử dụng trong lâm sàng với mục đích chẩn đoán. Thứ hai, kĩ thuật này cho phép chuyển gen bên trong cơ quan mà không xâm lấn, đặc biệt thích hợp chuyển gen vào những cơ quan như não mà các hệ chuyển gen khác không thực hiện được. Thứ ba, vùng chuyển gen có thể điều khiển đúng vị trí đích bằng cách chiếu sóng siêu âm vào vùng muốn điều trị. Cuối cùng, có thể kết hợp vừa điều trị và theo dõi kết quả điều trị qua hình ảnh thu được theo thời gian thực chỉ bằng những thiết bị đơn giản^[8, 12].

Tại Việt Nam, việc nghiên cứu ứng dụng trong lĩnh vực Y - Dược học công nghệ micro và nano dẫn chuyển thuốc đến đích là một lĩnh vực còn rất mới mẻ, ít được quan tâm nghiên cứu và các sản phẩm này vẫn chưa được áp dụng trong thực tế. Có lẽ lý do chính có thể chưa có các nhà khoa học được đào tạo, nghiên cứu và tiếp cận chuyển giao công nghệ này. Cho đến nay, mới chỉ có một số ít các công trình nghiên cứu công bố của Việt Nam liên quan đến bào chế thuốc nano liposom điều trị ung thư tại đích. Do vậy, các nhà khoa học cần được tạo cơ hội tìm hiểu, tiếp cận nghiên cứu bào chế và ứng dụng hệ vi bọt trong trị liệu gen đáp ứng nhu cầu trong nước và bắt kịp xu hướng thế giới.

Kết luận

Nghiên cứu đã phân tích thành phần và cấu trúc của hệ vi bọt, trong đó cụ thể hóa cấu trúc vi bọt kết hợp với acid nucleic và liên hợp với phối tử đặc hiệu cho chuyển gen hướng đích. Bên cạnh đó, cơ chế tăng cường hiệu quả chuyển gen của hệ vi bọt kết hợp siêu âm, các ưu điểm trong việc áp dụng hệ này trong chuyển gen và tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước cũng được thảo luận. Vi bọt kết hợp với siêu âm là một dạng bào chế đã được chứng minh tính an toàn, hiệu quả, thuận tiện, không xâm lấn trong điều trị bệnh, đặc biệt là u não. Tuy nhiên, ở Việt Nam, đây là một lĩnh vực mới, cần thúc đẩy hơn nữa việc đào tạo, tiếp cận và chuyển giao công nghệ.

Tài liệu tham khảo

1. Cochran M. and Wheatley M. A. (2013), "In vitro gene delivery with ultrasound-triggered polymer microbubbles", *Ultrasound in Medicine and Biology*, 39 (6), pp. 1102–1119.
2. Demachi F., Murayama Y., Hosaka N., Mochizuki T., Masuda K., Enosawa S., Chiba T., Oda Y., Suzuki R., Maruyama K. (2015), "Preliminary study on forming microbubble-surrounded cells as carriers for cellular therapy and evaluation of ultrasound controllability by fluorescence imaging", *Jpn. J. Appl. Phys.*, 54, 07HF19.
3. Endo - Takahashi Y., Negishi Y., Kato Y., Suzuki R., Maruyama K., Aramaki Y. (2012). "Efficient siRNA delivery using novel siRNA-loaded Bubble liposomes and ultrasound", *Int. J. Pharm.*, 422, pp. 504–509.
4. Endo - Takahashi Y., Negishi Y., Nakamura A., Ukai S., Ooaku K., Oda Y., Sugimoto K., Moriyasu F., Takagi N., Suzuki R. et al. (2014),

- "Systemic delivery of miR-126 by miRNA-loaded Bubble liposomes for the treatment of hindlimb ischemia", *Sci. Rep.*, 4, 3883.
5. Endo - Takahashi Y., Negishi Y., Nakamura A., Suzuki D., Ukai S., Sugimoto K., Moriyasu F., Takagi N., Suzuki R., Maruyama K. et al. (2013), "pDNA-loaded Bubble liposomes as potential ultrasound imaging and gene delivery agents", *Biomaterials*, 34, pp. 2807–2813.
 6. Fan C. H., Chang E. L., Ting C. Y., Lin Y. C., Liao E. C., Huang C. Y., Chang Y. C., Chan H. L., Wei K. C., Yeh C. K. (2016), "Folate - conjugated gene - carrying microbubbles with focused ultrasound for concurrent blood - brain barrier opening and local gene delivery", *Biomaterials*, 106, pp. 46–57.
 7. Fan C. H., Ting C. Y., Lin C. Y., Chan H. L., Chang Y. C., Chen Y. Y., Liu H. L., Yeh C. K. (2016), "Noninvasive, targeted, and non-viral ultrasound-mediated gdnf-plasmid delivery for treatment of parkinson's disease", *Sci. Rep.*, 6, 19579.
 8. Fan C. H., Ting C. Y., Lin H. J., Wang C. H., Liu H. L., Yen T. C., Yeh C. K. (2013). "SPIO - conjugated, doxorubicin - loaded microbubbles for concurrent MRI and focused - ultrasound enhanced brain - tumor drug delivery", *Biomaterials*, 34 (14), pp. 3706–3715.
 9. Hernot S., Klibanov A. L. (2008), "Microbubbles in ultrasound - triggered drug and gene delivery", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 60, pp. 1153–1166.
 10. Kim D. H., Costello M. J., Duncan P. B. and Needham D. (2003), "Mechanical properties and microstructure of polycrystalline phospholipid monolayer shells: Novel solid microparticles", *Langmuir*, 19 (20), pp. 8455–8466.
 11. Lentacker I., Wang N., Vandenbroucke R. E., Demeester J., De Smedt S. C., Sanders N. N. (2009), "Ultrasound exposure of lipoplex loaded microbubbles facilitates direct cytoplasmic entry of the lipoplexes", *Mol. Pharm.*, 6, pp. 457–467.
 12. Omata D., Negishi Y., Hagiwara S., Yamamura S., Endo - Takahashi Y., Suzuki R., Maruyama K., Nomizu M., Aramaki Y. (2011), "Bubble liposomes and ultrasound promoted endosomal escape of TAT-PEG liposomes as gene delivery carriers", *Molecular Pharmaceutics*, 8 (6), pp. 2416–2423.
 13. Paganelli G., Magnani P., Zito F., Villa E., Sudati F., Lopalco L., Rossetti C., Malcovati M., Chiolerio F., Seccamani E. et al. (1991), "Three - step monoclonal antibody tumor targeting in carcinoembryonic antigenpositive patients", *Cancer Res.*, 51, pp. 5960–5966.
 14. Pillai R., Marinelli E. R., Fan H., Nanjappan P., Song B., Von Wronski M. A., Cherkaoui S., Tardy I., Pochon S., Schneider M. et al. (2010), "A phospholipid - PEG2000 conjugate of a vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) - targeting heterodimer peptide for contrast - enhanced ultrasound imaging of angiogenesis", *Bioconjug. Chem.*, 21, pp. 556–562.
 15. Sirsi S. R. and Borden M. A. (2009), "Microbubble compositions, properties and biomedical applications", *Bubble science, Engineering and Technology*, 1, pp. 1–2, 3–17.
 16. Sirsi S. R., Hernandez S. L., Zielinski L., Blomback H., Koubaa A., Synder M., Homma S., Kandel J. J., Yamashiro D. J., Borden M. A (2012), "Polyplex - microbubble hybrids for ultrasound-guided plasmid DNA delivery to solid tumors", *J. Control. Release*, 157, pp. 224–234.
 17. Shimanovich U., Eliaz D., Zigdon S., Volkov V., Aizer A., Cavaco - Paulo A., Michaeli S., Shav - Tal Y., Gedanken A. (2013), "Proteinaceous microspheres for targeted RNA delivery prepared by an ultrasonic emulsification method", *J. Mater. Chem. B*, 1, pp. 82–90.
 18. Tlaxca J. L., Rychak J. J., Ernst P. B., Konkalmatt P. R., Shevchenko T. I., Pizzaro T. T., Rivera - Nieves J., Klibanov A. L., Lawrence M. B. (2013), "Ultrasound - based molecular imaging and specific gene delivery to mesenteric vasculature by endothelial adhesion molecule targeted microbubbles in a mouse model of Crohn's disease", *J. Control. Release*, 165, pp. 216–225.
 19. Wang F. et al. (2009), "Focused ultrasound microbubble destruction - mediated changes in blood - brain barrier permeability assessed by contrast - enhanced magnetic resonance imaging", *Journal of Ultrasound in Medicine*, 28 (11), pp. 1501–1509.
 20. Yan F., Xu X., Chen Y., Deng Z., Liu H., Xu J., Zhou J., Tan G., Wu J., Zheng H. A. (2015), "Lipopeptide - based $\alpha v \beta 3$ integrin - targeted ultrasound contrast agent for molecular imaging of tumor angiogenesis", *Ultrasound Med. Biol.*, 41, pp. 2765–2773.
 21. Yoshida M., Kawakami S., Kono Y., Un K., Higuchi Y., Maruyama K., Yamashita F., Hashida M. (2014), "Enhancement of the anti - tumor effect of DNA vaccination using an ultrasound-responsive mannose-modified gene carrier in combination with doxorubicin - encapsulated PE gylated liposomes". *Int. J. Pharm.*, 475, pp. 401–407.
 22. Zhou Y., Gu H., Xu Y., Li F., Kuang S., Wang Z., Zhou X., Ma H., Li P., Zheng Y. et al. (2015), "Targeted antiangiogenesis gene therapy using targeted cationic microbubbles conjugated with CD105 antibody compared with untargeted cationic and neutral microbubbles", *Theranostics*, 5, pp. 399–417.