

На правах рукописи



Супрунчук Виктория Евгеньевна

**НАНОБИОКОМПОЗИТ НА ОСНОВЕ ФУКОИДАНА КАК
СИСТЕМА ТАРГЕТНОЙ ДОСТАВКИ ТРОМБОЛИТИЧЕСКОГО
АГЕНТА**

03.06.01- Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Северо-Кавказский федеральный университет»

- Научный руководитель:** **Денисова Евгения Владимировна,**
кандидат биологических наук, доцент кафедры биомедицины и физиологии ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет»
- Официальные оппоненты:** **Ермакова Светлана Павловна**
доктор химических наук, доцент, заведующий лабораторией химии ферментов ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН»
- Бородина Татьяна Николаевна**
кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории биоорганических структур Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН
- Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения Российской академии наук» (ФГБУН Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН)

Защита состоится «15» декабря 2020 года в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 999.095.03 при РХТУ имени Д.И. Менделеева (125047, г. Москва, Миусская пл., 9) в конференц-зале (ауд. 443).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ имени Д.И. Менделеева, а также на официальном сайте <http://diss.muctr.ru/>.

Автореферат разослан « »

2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
Д999.095.03, к.т.н.



И. В. Шакир

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Биodeградируемые нанокомпози́ты, обладающие способностью к магнитному наведению, являются новым классом функциональных материалов, управляемые параметры которых способствуют расширению возможностей их клинического приложения.

Использование в качестве матрицы нанобиокомпозита такой полисахарид, как фукоидан, даст возможность получить уникальный биоактивный, биосовместимый, биodeградируемый материал. Фукоидан представляет собой высокосульфатированный геторополисахарид, где основным моносахаридным остатком выступает L-фукоза. Фукоидан применяется как компонент в разработке систем доставки лекарственных веществ (ЛВ)¹, в том числе в комбинации с наночастицами магнетита². Однако для данных целей используется низкомолекулярный полисахарид. В нативной же форме фукоидан, как правило, имеет высокий молекулярный вес, что ограничивает его применение. Поэтому актуальной является проблема поиска способа получения низкомолекулярной фракции фукоидана с сохранением его важнейших биологических свойств. Сам полисахарид обладает широким спектром биологической активности, а структурная модификация с помощью оксидов металлов, в частности магнетитом, позволит создавать нанокомпози́ты для адресной доставки ЛВ с контролируемым биораспределением. Активный таргетинг тканевого активатора плазминогена (ТАП) к целевому участку с помощью такого рода систем позволит осуществить локальное действие фермента, снизив системную токсичность препарата и риск возникновения ТАП-индуцированного кровоизлияния, с повышением его эффективности. Кроме того, увеличится «кажущийся» молекулярный размер фермента, что приведет к росту периода полувыведения ТАП, а, входящий в состав нанобиокомпозита фукоидан, позволит осуществить протекцию фермента от воздействия ингибитора (ИАП1), сокращающего время действия ТАП в плазме крови. В тоже время, существующие системы доставки ТАП с использованием фукоидана, основаны на пассивном таргетинге, где в качестве молекулярной мишени используется Р-селектин, к которому полисахарид проявляет высокую аффинность³.

¹ Oliveira C., Neves N.M., Reis R.L., Martins A., Silva T.H. Gemcitabine delivered by fucoidan / chitosan nanoparticles presents increased toxicity over human breast cancer cells// *Nanomedicine*. 2018. Vol. 13, № 16. P. 2037–2050

² Zamanlu M., Farhoudi M., Eskandani M., Mahmoudi J., Barar J., Rafi M., Omid Y. Recent advances in targeted delivery of tissue plasminogen activator for enhanced thrombolysis in ischaemic stroke // *J. Drug Target*. 2018. Vol. 26, № 2. P. 95–109

³ Juenet M., Aid-Launais R., Li B., Berger A., Aerts J., Ollivier V., Nicoletti A., Letourneur D., Chauvierre C. Thrombolytic therapy based on fucoidan-functionalized polymer nanoparticles targeting P-selectin // *Biomaterials*. Elsevier, 2018. Vol. 156. P. 204–216

Таким образом, синтез нанобиокомпозита, путем модификации фукоидана магнетитом, и применение его как магнитоуправляемого средства активного таргетинга тромболитического агента не было изучено ранее.

Целью работы является разработка эффективной системы активного таргетинга клинически важного тромболитического фермента (тканевого активатора плазминогена) на основе низкомолекулярного фукоидана функционализированного наночастицами магнетита.

Для достижения цели были сформулированы следующие **задачи**:

- провести анализ влияния высокоинтенсивной низкочастотной ультразвуковой обработки фукоидана на ультраструктуру макромолекул, их гидродинамические параметры и биологическую активность, а также подобрать оптимальные условия для получения воспроизводимой методики создания наноразмерных частиц фукоидана;

- разработать метод функционализации фукоидана магнетитом применимого для формирования биокомпозитов близких к наноразмерному ряду, с исследованием особенностей условий формирования и влияния соотношения компонентов процесса;

- протестировать полученные нанобиокомпозиты в качестве носителей такого ферментного тромболитического агента как тканевого активатора плазминогена;

- исследовать эффективность взаимодействия «фермент-носитель» путем иммобилизации ТАП за счет образования связей ковалентной и не ковалентной природы, провести анализ полученных систем, а также определить каталитическую активность иммобилизованного фермента *in vitro*;

- изучить физико-химические свойства и цитотоксичность полученных нанобиокомпозитов при варьировании способа иммобилизации фермента.

Научная новизна работы. Впервые получены наночастицы фукоидана (со средним диаметром 38 ± 5 нм) в результате высокоинтенсивной низкочастотной ультразвуковой обработки нативного полисахарида, выделенного из бурой водоросли *Fucus vesiculosus*. Проведено систематическое исследование такого воздействия на ультраструктуру, степень сульфатированности, а также биологическую активность полисахарида. Кроме того, впервые рассмотрено применение фукоидана как самостоятельного носителя, предварительно функционализированного магнетитом, путем формирования нанобиокомпозита для таргетной доставки тромболитического агента. Обнаружена корреляция величины размера полученных композитов с количеством иммобилизованного фермента.

Разработанная схема получения нанобиокомпозита с иммобилизованным тромболитическим ферментом позволяет пролонгировать действие терапевтической дозы препарата с некоторым сохранением биоэффекта после иммобилизации. Данный способ

получения нанобиокompозитов с иммобилизованным тканевым активатором плазминогена совместно с магнитным наведением позволяет повысить восприимчивость фибриновых сгустков к лизису благодаря локализации тромболитического агента в области тромба с проникновением его непосредственно в тело сгустка. Такие системы доставки с активным таргетингом и низким токсическим действием позволяют получать тромболитические препараты с пролонгированным действием для направленного восстановления кровотока в сосуде.

Теоретическая и практическая значимость работы:

- оптимизирована система деполимеризации фукоидана путем систематического исследования условий высокоинтенсивной низкочастотной ультразвуковой обработки полисахарида с формированием;

- разработан метод формирования фукоидансодержащего композита применимого в таргетной доставке ферментного препарата соответствующих принципам «зеленой химии». Исследована зависимость физико-химических свойств от состава материала.

- осуществлена иммобилизация тромболитического агента на полученные носители путем ковалентного и не ковалентного взаимодействия «фермент-носитель». Изучены физико-химические и морфологические характеристики полученных композитов, а также каталитические возможности иммобилизованного тканевого активатора плазминогена.

Полученная эмпирическая база позволит усовершенствовать существующие системы активного таргетинга. Результаты работы могут быть использованы для нужд медицинской и фармацевтической промышленности при разработке тромболитической инъекционной лекарственной формы.

Апробация работы. Результаты диссертации доложены на 4 региональных, 1 всероссийской и 2 международных конференциях: XIX международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» по направлению «Химия живых систем, нанобиоматериалы и нанобиотехнологии» (г. Москва, 2013); региональная научно-практическая конференция «Инновационные идеи молодежи Ставропольского края - развитию экономики России», проводимой в рамках программы «УМНИК» Федерального Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (победитель в номинации Умник РФ) (Ставрополь, 2015); Региональная научно-практическая конференция «Биотехнологии будущего в медицине, фармации и пищевой промышленности» (г. Ставрополь, 2016); XV Курчатовская междисциплинарная молодежная научная школа (Москва, 14-17 ноября 2017 г.); Региональная научно-практическая конференция «Университетская наука - региону» (г. Ставрополь, 2011, 2017); Международная научно-

практическая конференция «Фармацевтическая технология: вчера, сегодня, завтра» (Пятигорск, 2019). Некоторые аспекты работы разрабатывались в рамках школ и стажировок в ведущих научных организациях: Центр «Биоинженерия» РАН (г. Москва, 2012), Казанский национальный исследовательский технологический университет (г. Казань, 2015), Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики (г. Санкт-Петербург, 2018).

Получен патент на изобретение №218.016.631С (от 16.06.2018) «Способ получения полисахаридсодержащих полимерных матриц».

Публикации. По теме диссертации имеется 9 опубликованных работ, в том числе 4 статьи в реферируемых научных журналах, 5 тезисов докладов на российских и международных конференциях, получен 1 патент.

Содержание диссертации. Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста и включает 33 рисунка, 7 таблиц, 2 схемы, 3 формулы. Список литературы включает 305 источников. Работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения и списка литературы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность исследования, определены цель и задачи, а также научная новизна и практическая значимость работы.

В первой главе осуществлен анализ литературных источников по теме диссертационного исследования, где охарактеризован основной компонент получаемых нанобиокомпозитов – фукоидан, включая вопрос о наименовании данного полимера, способах извлечения, структурных особенностях и их взаимосвязи с биологическими свойствами, а также основные приложения полисахарида в разработке систем доставки. Кроме того, уделено внимание рассмотрению существующих и разрабатываемых направлений доставки такого тромболитического фермента, как тканевой активатор плазминогена.

Во второй главе изложена информация о экспериментальной части исследования, где содержится характеристика метода деградации фукоидана, создания нанобиокомпозитов и иммобилизации тромболитического агента, а также методах исследования полученных частиц, биологических свойств, цитотоксичности биокомпозитов и каталитической активности связанного фермента.

В третьей главе приведены результаты исследований и их обсуждение:

1. Подбор оптимальных условий контролируемой ультразвуковой деградации фукоидана

Сонохимическая обработка исходного фукоидана проводилась при частоте 20 кГц в течении 40 мин с варьированием интенсивности 100 Вт/см², 133 Вт/см², 200 Вт/см². Анализ СЭМ-изображений показал, что первоначальный размер частиц полисахарида достигал 8,21 ±0,17 мкм, который с приложением ультразвуковой энергии значительно падает (рисунок 1 А, Б). При интенсивности 100 Вт/см² размер частиц варьируется от 395,7±69,4 до 1702,3±166,6 нм, при 133 Вт/см² - от 73,6±14,5 до 423±58 нм (крупные конгломераты частиц в расчете не были учтены), при 200 Вт/см² - от 38,4±5,4 до 119,6±17 нм. Наличие конгломератных структур в образцах и не линейный характер изменения размера частиц в процессе УЗ-обработки могут быть связаны осцилляцией кавитационных пузырьков, ударная волна которых, при схлопывании, приводит к изменениям микроструктуры, морфологии частиц, их сшиванию.

Введение ПАВ (ПЭГ-400 и ДСН) при сохранении условий ультразвуковой обработки (I=133 Вт/см²) привело к постепенному снижению гидродинамического радиуса с увеличением времени ультразвуковой обработки по экспоненциальной зависимости, характерного для механического эффекта сонолиза (рисунок 1 В). После первой минуты обработки размер частиц в условиях введения ПАВ сократился значительно меньше (до 6,5±0,4 мкм для ПЭГ и до 5,8±0,3 мкм для ДСН), чем при тех же условиях, но без внесения ПАВ (до минимального 135,07±44,95 нм). Эффективность ультразвукового воздействия максимальна в течении первых 10 мин, после чего снижается, в связи с образованием фрагментов с низкой молекулярной массой, являющихся более жесткими и требующих больших затрат энергии на их дальнейшую деполимеризацию.

Степень сульфатированности после 40 мин обработки при I=133 Вт/см² и 200 Вт/см² без присутствия ПАВ упала на 3,63% и 3,12% соответственно по сравнению с исходным полисахаридом. Исключение составляет обработка полисахарида при 100 Вт/см², где наименьшая степень сульфатированности наблюдается после 40 мин УЗ-обработки (степень сульфатированности снизилась на 12,09%), что может быть связано с механической десульфатацией. В присутствии ДСН степень сульфатированности снизилась на 9,61% и на 12,32% при наличии ПЭГ

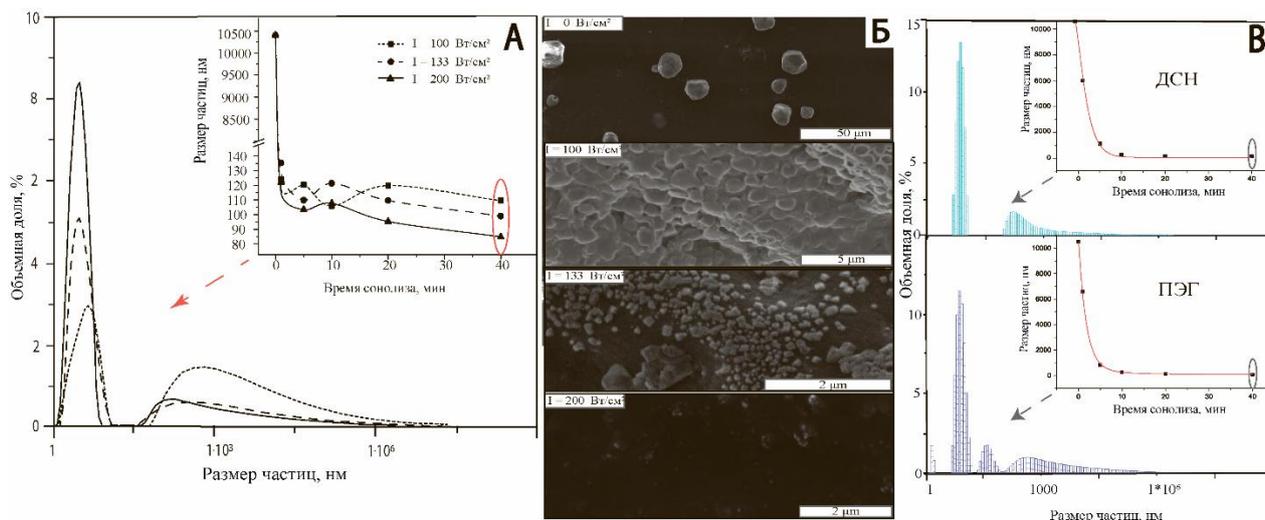


Рисунок 1 – Распределение частиц фукоидана после УЗ-обработки: (А) – Гидродинамический диаметр частиц деполимеризованного фукоидана после УЗ-обработки в течение 40 мин при варьировании мощности воздействия; (Б) – СЭМ-изображения частиц фукоидана после УЗ-обработки при варьировании мощности воздействия; (В) – Гидродинамический диаметр частиц деполимеризованного фукоидана после УЗ-обработки в течение 40 мин (20 кГц) при внесении ПАВ.

2. Анализ зависимости биологической активности фукоидана от условий ультразвуковой деградации и состава среды

В ходе работы выявлено уменьшение антиоксидантной активности фукоидана относительно его исходной формы (интенсивность хемилюминесценции для природного фукоидана составила $I/I_0=0,79\pm 0,026$) с повышением интенсивности ультразвука.

Таблица 1.

Антикоагулянтная активность фукоидана в зависимости от интенсивности ультразвукового воздействия и присутствия ПАВ

Образец	Условия получения (I Вт/см ² ; ПАВ)	ПВ, с	ТВ, с	АЧТВ, с
1А	-	22,2±1,02	16,49±0,29	51,9±1,71
2А	100	28,7±0,98	15,81±0,49	45,7±1,51
2В	133	32,8±1,44	15,13±0,53	44,5±1,47
2С	200	33,4±1,49	20,15±0,34	52,8±1,78
2В'	133; ДСН	50,6±1,73	20,63±0,98	51,1±1,69
2В''	133; ПЭГ	53,2±1,77	23,12±0,54	52,4±1,73
0,9% NaCl	-	19,3±0,82	8,40±0,14	28,8±0,95
10 мг/мл гепарина	-	37,6±0,95	<300	276,6±9,15

Также при определении пути ингибирования коагуляционных процессов, подтверждено влияние обработанного фукоидана на внешний и внутренний пути свертывания крови (таблица 1). Благодаря более низкой антикоагулянтной активности, по сравнению с гепарином, а также лучшей абсорбционной способностью полученный фукоидан может быть использован в разработке средств для тромболитической терапии.

3. Стратегии функционализации фукоидана наночастицами магнетита

Формирование нанобиокомпозита осуществлялась двумя способами: методом модификации деполимеризованного фукоидана магнетитом (метод I) и ультразвуковой обработкой исходного фукоидана в присутствии НЧ магнетита (метод II).

Измерения размера частиц биокомпозита (метод I) с помощью ДРС показали, что гидродинамический диаметр варьируется от $227,4 \pm 23,8$ до $126,3 \pm 14,6$ в зависимости от содержания полисахарида, а повышение электрохимического потенциала до максимального $12,46 \pm 0,81$ мВ, что облегчит дальнейшую иммобилизацию ТАП. Наблюдаемый рост гидродинамического диаметра частиц формируемого композита при увеличении концентрации фукоидана обусловлен многократной межмолекулярной ассоциацией фукоидан-фукоидан и фукоидан-композит с образованием агрегатов благодаря присутствию НЧ Fe_3O_4 .

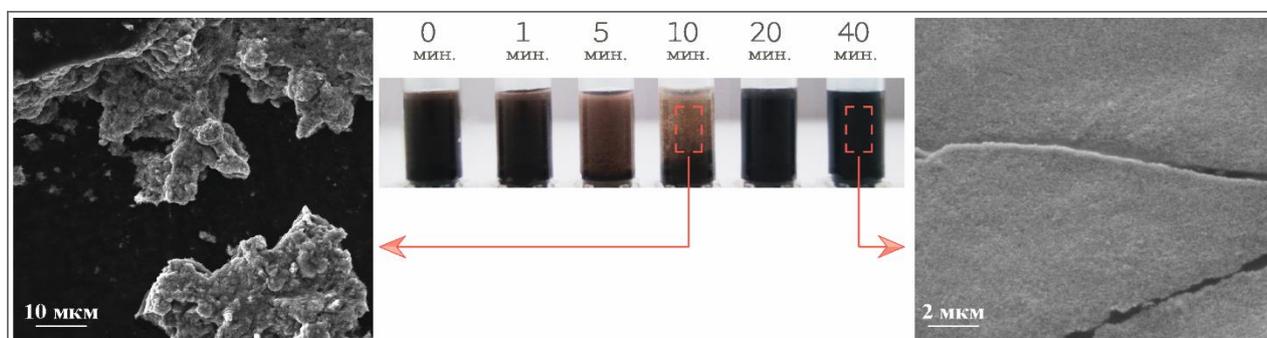


Рисунок 2 – Морфология нанобиокомпозита полученного ультразвуковой обработкой исходного фукоидана в присутствии НЧ магнетита

Низкочастотная УЗ-обработка системы, содержащей нативный фукоидан и наночастицы магнетита, осуществлялась с интенсивностью 133 Вт/см^2 в течении 40 мин (метод II). При этом выявлено, что на первых этапах (в течении первых 10 мин) процессы агрегации преобладают, образуются крупные агломераты (рисунок 2), что приводит к неустойчивости коллоидной системы, однако при увеличении времени воздействия до 40

мин происходит разрушение сформированных агрегатов с образованием частиц меньшего размера, а увеличение дзета-потенциала приводит к замедлению процессов коагуляции.

3.1 Иммобилизация тромболитического агента

Адсорбция тромболитического агента осуществлялась за счет электростатического взаимодействия образцов функционализированного фукоидана ФМА (полученного методом I) и ФМУз (полученного методом II), несущими положительный заряд, и молекул фермента. Ковалентная иммобилизация ТАП была реализована с применением глутарового альдегида на образцах ФМА. Глутаровый альдегид позволит иммобилизовать ТАП за счет связывания фермента с доступными гидроксильными группами.

Наблюдаемый отрицательный дзета-потенциал частиц при загрузке ТАП (таблица 2) согласуется с литературными данными. Электростатического отталкивания отрицательно заряженной поверхности полученных наноконкомпозитов, содержащих фермент, и отрицательно заряженной поверхности клеток крови, позволит избежать агрегации с кровяными тельцами и исключить их клеточное поглощение.

Таблица 2

Обобщенные данные полученных типов нанобиоконкомпозитов с иммобилизованным ферментом

Тип биоконкомпозита	0,1 М ФСБ			0,1% ДСН		
	Средний гидродинамический диаметр частиц, нм	Индекс полидисперсности	Дзета-потенциал, мВ	Средний гидродинамический диаметр частиц, нм	Индекс полидисперсности	Дзета-потенциал, мВ
ФМА	264,3	0,029	- 8,68 ± 0,18	136,5	0,027	-10,39± 0,15
ФМГа	369,7	0,02	- 1,66 ± 0,06	119,9	0,018	- 9,9 ± 0,11
ФМУз	148,3	0,026	- 9,01 ± 0,21	137,1	0,024	- 9,43 ± 0,16

Гидродинамический диаметр изменяется с варьированием состава и способа формирования частиц. Максимальное среднее значение 369,7 нм наблюдается для частиц нанобиоконкомпозита с ковалентно-связанным ТАП (ФМГа). Причиной повышения размера может является агрегирование в результате небольшого значения поверхностного заряда композита (всего -1,66±0,06 мВ), приводящий к слабому электростатическому отталкиванию

между наночастицами. Электростатическое отталкивание между частицами за счет введения ПАВ позволило уменьшить возможность агрегации, что привело к снижению размера.

Варьирование концентрации ТАП используемого для иммобилизации на разработанные матрицы привело к увеличению роста частиц с высокой корреляцией «размер-концентрация фермента» для образцов ФМГа и ФМА. Более худший показатель выявлен для ФМУз, что может быть связано с изменением свойств поверхности при высокоинтенсивном ультразвуковом воздействии. Изменения поверхностных свойств коллоидов также зависят от pH среды. При иммобилизации фермента наблюдается снижение дзета-потенциала с максимального значения $12,46 \pm 0,81$ мВ (для ФМУз) до минимального - $9,01 \pm 0,21$ (для ФМУз), при этом поверхностный заряд снижается с ростом значения pH, что свидетельствует о успешной иммобилизации тромболитического агента. Морфология и размер наноконкомпозитов фукоидан/магнетит была рассмотрена с помощью СЭМ. Вследствие ассоциации и усадки в процессе сушки перед СЭМ композиты имели форму крупных агрегатов (рисунок 3).

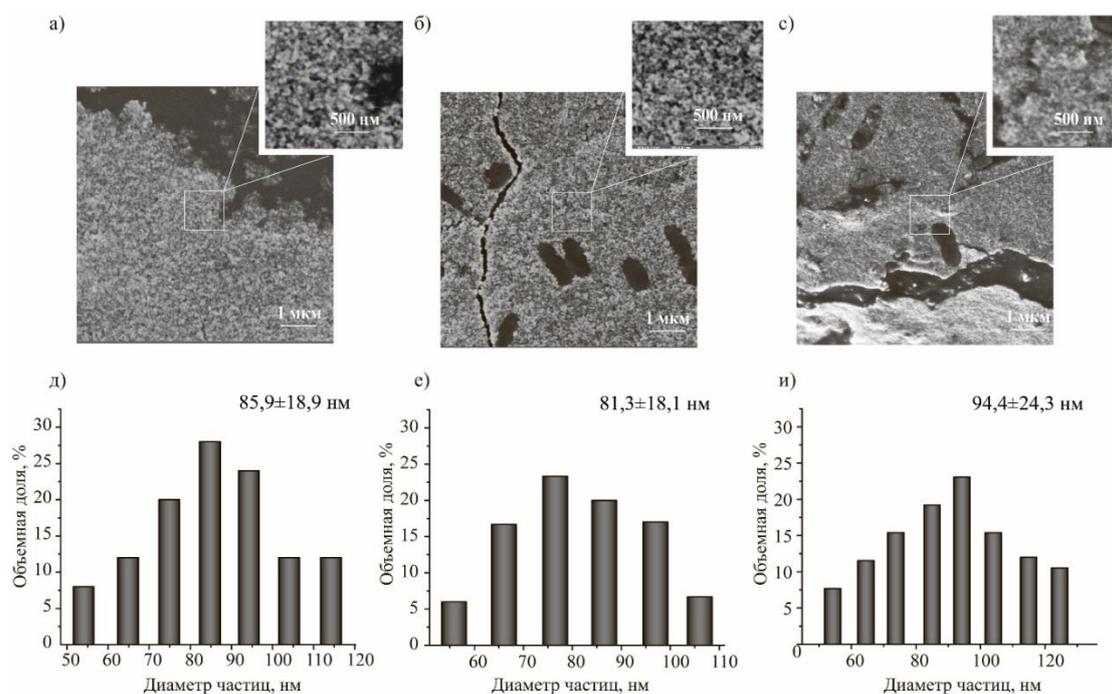


Рисунок 3 – СЭМ-изображения бионаноконкомпозитов с иммобилизированным тромболитическим агентом: а) – ФМА, б) – ФМУз, в) – ФМГа

Измерение намагничиваемости наночастиц полученных нанобиоконкомпозитов осуществляли при 300 К. Кривые образцов указывают на суперпарамагнитное поведение с нулевой остаточной магнитной индукцией с отсутствием гистерезиса. Намагниченность

достигает насыщения для золя магнетита около $73,8 \pm 3,4$ кА/м (известно, что максимальное значение может достигать 90 кА/м в зависимости от размера частиц золя), для дисперсии образца ФМГа – $10,8 \pm 1,9$ кА/м, ФМУз – $47,7 \pm 2,7$ кА/м и ФМА – $57,1 \pm 2,3$ кА/м. Коэрцитивность образцов уменьшается с увеличением размера частиц, что возможно связано с увеличением доли органических компонентов. Образцы ФМГа насыщены уже при напряжённости магнитного поля 103 кА/м, тогда как остальные образцы демонстрируют еще увеличивающийся магнитный момент. Высокие показатели значений намагничиваемости и суперпарамагнетизм способствуют наведению с помощью магнитного поля к месту тромба, а также возможности проникновения наночастиц композита в него. Снижение значения насыщения намагничиваемости может быть связано с изменением доли МНЧ магнетита в образцах композита, наличием оболочки фермент/полисахарид и фермент или некоторыми поверхностными эффектами, связанными с процессами окисления магнетита.

3.2 Количество и каталитическая активность иммобилизованного ТАП

Загруженные полимерные магнитокомпозиты проявили разную способность удерживать ТАП. В соответствии с полученными экспериментальным профилем высвобождения ТАП из сформированных наночастиц в модельную среду наблюдается двухступенчатый характер выпуска. Сильное начальное высвобождение фермента, так называемый взрывной или бёрст-эффект, наблюдается в течение первых 40 мин проведения эксперимента и достигает максимального значения $72,9 \pm 1,01$ % для ФМУз, после чего релиз замедляется. В целом, наблюдается пролонгированное высвобождение тромболитического фермента в течении 6 ч. для всех образцов носителей. Первоначальный выпуск более 50% достаточен для растворения сформированных тромбов, а последующее более медленное высвобождение оставшегося ТАП способствует предотвращению образования новых тромбов⁴. ФМГа демонстрирует самый медленный и наименьший кумулятивный выпуск тромболитического агента среди всех образцов биокомпозитов в связи с тем, что высвобождение фермента предполагает разрыв линкерных связей. Однако возможно, что данный тип композита сочетает в себе два способа иммобилизации фермента – сорбцию в порах и на поверхности носителя и химическое сшивание с матрицей-носителем. Эффективность включения ТАП снижается при попытке иммобилизации фермента на поверхности нанокомпозита путем формирования ковалентных связей более чем на 31,53%. Таким образом, результаты определения степени связывания и эффективность включения,

⁴ Kim J., Park J., Byun Y., Kim C. Biomaterials The use of PEGylated liposomes to prolong circulation lifetimes of tissue plasminogen activator // Biomaterials. Elsevier Ltd, 2009. Vol. 30, № 29. P. 5751–5756.

показали низкую эффективность применения метода химической сшивки с помощью глутарового альдегида. Большой способностью к иммобилизации тромболитического агента обладал образец, полученный за счет сил электростатического взаимодействия биокомпозит-ТАП.

Препараты ферментов чувствительны к воздействию внешних факторов и в процессе иммобилизации могут частично терять свою активность, поэтому существует необходимость определения активности связанного тромболитического агента. Сохранение каталитической активности ТАП заключалась в изучении его амидолитической и фибринолитической активности *in vitro*.

Амидолитическая активность характеризует протеазную способность фермента на основе гидролиза специфического хромогенного субстрата. Активность ТАП, иммобилизованного на образцах нанобиокомпозита, была ниже, чем у свободного ТАП (на 62,53% меньше для ФМА, на 71,8% - ФМУз, на 90,27% - ФМГа), что свидетельствует о сильном взаимодействии ТАП с образцами нанокомпозитов приводящее к подавлению активности фермента. Максимальное подавление ферментативной активности наблюдается при использовании поперечно-сшивающего агента, где активность снижается в 3,85 и 2,9 раза, по сравнению с молекулами ТАП, связанные с носителями ФМА и ФМУз соответственно, что может быть обусловлено стерическими препятствиями для активного центра фермента в результате неправильного сворачивания белка под действием формируемых связей или возможным участием в химической сшивке аминокислотных остатков фермента отвечающих за распознавание субстрата.

Для исследования фибринолитической активности нами были использованы модели тромбов: фибриновые сгустки, фиксированные на предметном стекле и в агарозном геле в условиях наличия и отсутствия магнитного наведения. С помощью модели на предметном стекле, было выявлено начало тромболизиса в статических условиях уже на 30 минуте от начала эксперимента. Максимальная деградация сгустка наблюдается через 300 мин. взаимодействия фибриновый сгусток-нанокомпозит. Самое короткое время лизиса модельных тромбиновых сгустков в различных условиях отмечено для ФМА, что может быть связано с более быстрым начальным выпуском ТАП. Напротив, более длинный период разрушения тромба наблюдается для ФМГа имеющих самый замедленный выпуск фермента (рисунок 4 в, г).

Определение фибринолитической активности в плазме крови осуществлялось с целью выявления наличия защитных механизмов ТАП от дезактивации под действием ингибиторов в результате конкурентного связывания с фукоиданом. Результаты анализа с использованием

фибрин-агарозной матрицы показали, что лизис фибриновых сгустков, индуцированный ТАП адсорбированный на носителе-композите был на 28 и 50% (без магнитного наведения) и на 36 и 51% (с магнитным наведением) эффективнее, чем индуцированный ковалентно-связанным тромболитическим агентом (образец ФМГа). Это свидетельствует о более быстром высвобождении фермента, что подтверждается изменением кинетических кривых выпуска белка.

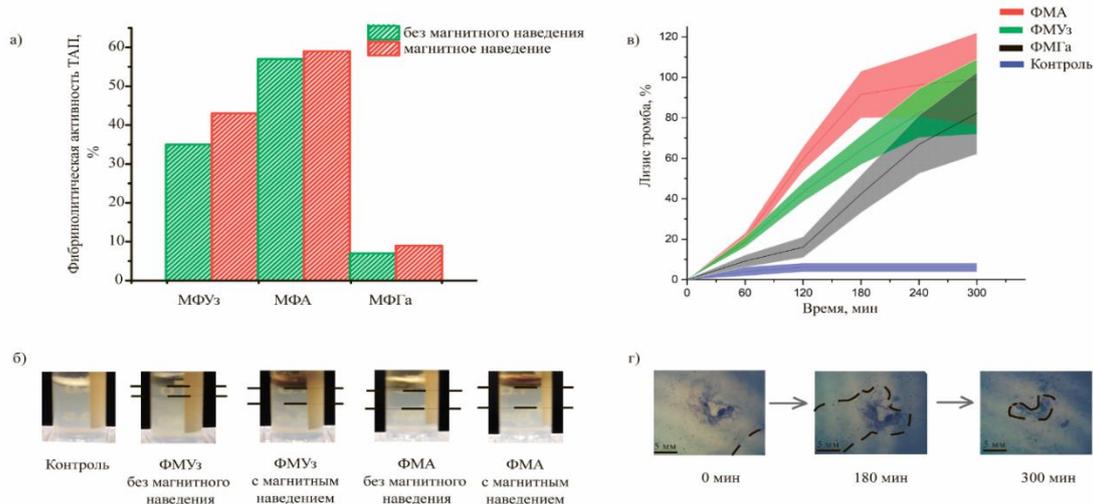


Рисунок 4 - Активность иммобилизованного ТАП, исследованная на различных моделях тромбов: а) и б) на фибриновых сгустках, фиксированных в агарозном геле; в) на стекле и г) динамики лизиса фибринового сгустка на стекле с нанесенным ФМУз

3.3 Исследование цитотоксичности нанобиокомпозитов *in vitro*

Целью данного этапа работы было определение биосовместимости, одной из характеристик которой является токсичность материала.

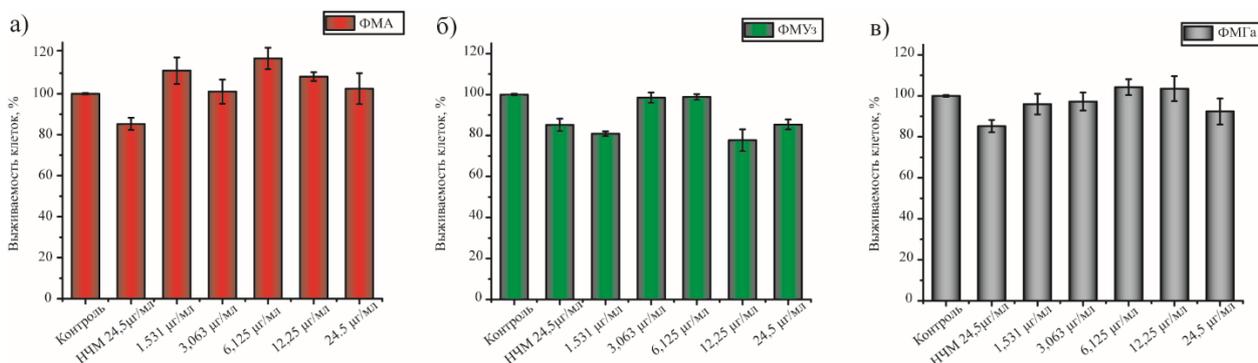


Рисунок 5 – Жизнеспособность клеток HeLa при использовании золя магнетита и варьировании концентрации (0; 1,531; 3,063; 6,125; 12,25; 24,5 µg/ml) и типа нанобиокомпозита при инкубации в течении 72 ч.

Цитотоксичность определяли *in vitro* на основе МТТ-теста на клеточной линии HeLa в зависимости от концентрации нанобиокомпозитов. Выживаемость клеток превышала 77% в присутствии всех концентраций образца ФМУз, и 85% для образцов ФМА, ФМГа (рисунок 5).

Для полисахарид-оксидного композита ФМА отмечено повышение митохондриальной активности клеточной культуры во всех концентрациях, с максимальным увеличением в 1,17 раза по сравнению с контрольным образцом для при концентрации 6,125 мкг/мл. При применении всех типов нанобиокомпозитов, в большинстве случаев, наблюдается более высокая выживаемость клеток, чем при использовании золя магнетита той же концентрации. Золи частиц нанобиокомпозитов ФМГа и ФМУз приводили к достоверному снижению митохондриальной активности с ростом доли погибших клеток, т.е. обладали большей токсичностью в отношении раковых клеток, что возможно связано с запуском механизмов апоптоза под действием фукоидана⁵. В целом, наблюдается снижение цитотоксического эффекта магнетита при применении его в разработанном биокомпозите.

ВЫВОДЫ

1) Подобраны оптимальные условия получения частиц низкомолекулярного фукоидана с помощью высокоинтенсивного низкочастотного ультразвукового воздействия с минимальным радиусом 38 ± 5 нм.

2) Анализ биологических и физико-химических исследований продемонстрировали зависимость изменения размера, биологической активности и степени сульфатированности от условий ультразвуковой деградации и состава среды. Изучена динамика изменения степени сульфатированности и антиоксидантной активности фукоидана в ходе сонолиза. Выявлено, снижение степени сульфатированности фукоидана, максимальное в присутствии неионогенного ПАВ. Также установлен рост антиоксидантной активности в процессе увеличения времени и интенсивности воздействия, но с достоверным ее снижением относительно нативного фукоидана.

3) Исследовано влияние обработанного полисахарида на коагуляционную систему плазмы крови человека. Установлена способность обработанного фукоидана продлевать время свертывания плазмы человека *in vitro*. Доказано его воздействие на внешний и

⁵ Synytsya A., Kim W., Kim S., Pohl R., Synytsya A., Kvasnic F., Jana C. Structure and antitumour activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida* // Carbohydr. Polym. 2010. Vol. 81, № 1. P. 41–48.

внутренний пути свертывания крови, а также рост активности обработанного полисахарида по сравнению с исходным фукоиданом.

4) Разработан метод получения эффективной магнитоуправляемой таргетной системы доставки ферментативного препарата на основе полученных наночастиц фукоидана, функционализированных магнетитом. Исследовано влияние функционализации фукоидана на электрокинетический потенциал, размер частиц, выход нанобиокомпозита.

5) Предложен метод синтеза нанобиокомпозитов с иммобилизованным тромболитическим агентом на основе природного полимера, имеющих высокую степень загрузки и намагничиваемости, низкую степень полидисперсности. Изучена динамика высвобождения фермента с установлением срока пролонгации действия в течении 6 ч.

6) Показана высокая степень намагничиваемости, что характеризует способность к наведению с помощью магнитного поля к месту тромба. Само же магнитное наведение привело к незначительному увеличению степени фибринолиза *in vitro* в плазме крови человека при использовании фибрин-агарозных гелей.

7) Доказано частичное сохранение каталитической активности иммобилизованного тромболитического агента и низкая цитотоксичность полученных препаратов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК :

1. **Suprunchuk, V. E.** Low-molecular-weight fucoidan: Chemical modification, synthesis of its oligomeric fragments and mimetics // Carbohydrate Research. 2019. P. 107806.
2. **Suprunchuk V. E., Denisova E.V., Andrusenko S.F., Melchenko E.A.** Biocomposite containing fucoidan for drug delivery // Int. J. Biol. Biotech. 2019. Vol. 16. № 3. P. 623–625.
3. Denisova, E. V., **Suprunchuk V. E., Dronova A. A.** Biopolymeric materials containing brown algae polysaccharides // Entomology and Applied Science Letters. 2017. Vol. 4. № 2. P. 19–23.
4. **Супрунчук В. Е., Денисова Е.В.** Фукоидан как компонент при разработке таргетных систем доставки лекарственных веществ //Молекулярная медицина. 2019. Т. 17. № 5. С. 23–30.
5. **Супрунчук В. Е., Денисова Е. В., Андрусенко С. Ф., Бондарь Т. П.** Оценка капсулирования и высвобождения белка из микрочастиц, содержащих фукоидан в условиях введения ПАВ/ //Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2018. Т. 8. №. 3. С. 92-98.

6. Денисова Е. В., **Супрунчук В. Е.** Белок-полисахаридные микрокапсулы // Наука. Инновации. Технологии. 2017. № 2. С. 199–206.

7. Денисова Е. В., Бегдай И. В., Андрусенко С. Ф., **Супрунчук В. Е.**, Кораблинова Н. В., Фофанова Д. Ю. Оригинальная биотехнология получения матриц, содержащих маннан и фукоидан, для фармацевтических целей // Наука. Инновации. Технологии. 2015. № 1. С. 157–166.

8. Денисова, Е. В., **Супрунчук В. Е.**, Горбачева А. А., Ширинян М. Г. Формирование микрокапсул на основе фукоидана путем внешнего и внутреннего гелеобразования // Наука. Инновации. Технологии. 2015. № 2. С. 179–186.

Авторские свидетельства или патенты:

Способ получения полисахаридсодержащих полимерных матриц: пат. 2657608 Рос. Федерация: МПК А61К 47/32, А61К 47/36, В01J 13/00, В01J 13/18/ Денисова Е.В, **Супрунчук В.Е.**, Андрусенко С.Ф., Филиппова А.М.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Кавказский федеральный университет» - № 218016631С; заявл. 04.04.2017; опубл. 14.08.2018, бюл. № 17.