

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Северо-Кавказский федеральный университет»

На правах рукописи



СУПРУНЧУК ВИКТОРИЯ ЕВГЕНЬЕВНА

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

03.01.06- Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Денисова Е. В.

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	11
1.1. Фукоидан в разработке таргетных систем доставки лекарственных веществ: основные положения	11
1.1.1. Структурные особенности фукоидана.....	11
1.1.2. Зависимость биологической активности фукоидана от структурных характеристик.....	15
1.1.3. Фукоидан как компонент при создании таргетных систем доставки лекарственных веществ	25
1.2. Проблема разработки и применения систем доставки тканевого активатора плазминогена	35
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	43
2.1. Методики получения материалов	43
2.1.1. Выделение очищенного фукоидана	43
2.1.2. Ультразвуковая обработка раствора фукоидана	43
2.1.3. Способы функционализации фукоидана магнетитом	44
2.1.4. Иммобилизация тромболитического агента.....	45
2.2. Физико-химические методы исследования.....	45
2.2.1. Оценка параметров и распределения частиц.....	45
2.2.2. Определение степени сульфатированности фукоидана.....	46
2.2.3. Определение антиоксидантной активности фукоидана до и после ультразвуковой обработки	47
2.2.4. Коагулологический анализ плазмы крови человека в присутствии фукоидана.....	47
2.2.5. Определение содержания тромболитического агента.....	48
2.2.6. Определение магнитных свойств нанобиокмполитов	49
2.2.7. Определение каталитических свойств иммобилизованного ТАП....	50
2.2.8. Оценка высвобождения тромболитического агента.....	52
2.2.9. Определение цитотоксичности с помощью МТТ-анализа	52
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	54
3.1. Подбор оптимальных условий контролируемой ультразвуковой деградации фукоидана	54

3.1.1. Анализ ультраструктуры и гидродинамические параметры образцов фукоидана.....	55
3.1.2. Изменение степени сульфатированности фукоидана при сонохимической обработке.....	66
3.1.3. Влияние высокоинтенсивного низкочастотного ультразвукового воздействия на биологическую активность фукоидана.....	68
3.2. Стратегии функционализации фукоидана наночастицами магнетита	74
3.3. Биокompозитный материал как носитель тканевого активатора плазминогена	81
3.3.1. Морфология и размер частиц бионанокompозита с иммобилизованными молекулами фермента	83
3.3.2. Исследование магнитных характеристик нанобиокompозитов	88
3.3.3. Высвобождение тромболитического агента	89
3.3.4. Количество и активность иммобилизованного ТАП	92
3.3.5. Исследование цитотоксичности нанобиокompозитов <i>in vitro</i>	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	106
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	112
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	114

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Нанобиокомпозиты имеют широкий спектр направлений практического применения, в частности в области формирования материалов медицинского и фармацевтического назначения. Биodeградируемые нанокompозиты, обладающие способностью к магнитному наведению, являются новым классом функциональных материалов с управляемыми параметрами, способствующих расширению возможностей их клинического приложения. При этом использование полисахаридов в таких системах в качестве альтернативы синтетическим полимерам позволит исключить применение токсичных растворителей [1], а наличие в их структуре нескольких реакционноспособных групп на каждое звено – формировать устойчивые комплексы со многими соединениями. Подобные гибридные полисахарид-неорганические системы в сочетании с управлением магнитным полем применимы в качестве носителей биологически активных веществ в таргетной терапии. Причем применение для целевой доставки именно магнитного наведения имеет ряд преимуществ по сравнению с некоторыми другими методами активного таргетинга. Во-первых, магнитное поле, например в отличие от ультразвуковых волн, не имеет ограничения глубины проникновения в ткани [2,3], во-вторых, не повреждает клетки нервных и мышечных тканей, как сильные электрические поля [2,4].

Использование в качестве матрицы нанобиокомпозита такого полисахарида, как фукоидан, даст возможность получить уникальный биоактивный, биосовместимый, биоразлагаемый материал. Фукоидан представляет собой высокосульфатированный гетерополисахарид, где основным моносахаридным остатком выступает L-фукоза, обладает широким спектром биологической активности в частности благодаря своей способности выступать в качестве миметиков природных лигандов белковых рецепторов и применяется как компонент в разработке системы доставки лекарственных средств [5,6], в том числе в комбинации с наночастицами магнетита, где полисахарид выступает только в роли гидрофильного покрытия, изменяющего физико-химические характеристики

поверхности [7,8]. Для этих целей используется низкомолекулярный полисахарид. Однако в нативной форме фукоидан, как правило, имеет высокий молекулярный вес, что ограничивает его применение и снижает эффективность действия. Поэтому актуальной является проблема поиска способа получения низкомолекулярного фукоидана путем деполимеризации полисахарида с сохранением его биологической активности.

В то же время магнитные частицы, в частности наночастицы магнетита, являются перспективным компонентом при разработке системы доставки благодаря биосовместимости, низкой стоимости, простоте синтеза позволяющим осуществлять активный таргетинг [9]. Однако, несмотря на физиологическую инертность магнитных частиц, они мало применимы как носители лекарственных веществ (ЛВ), так как в связи с малыми размерами, а также в результате опсонизации могут легко поглощаться ретикулоэндотелиальной системой [10] при попадании в кровяное русло. В свою очередь, при функционализации фукоидана такими частицами возможно продлить время циркуляции в кровотоке наночастиц магнетита за счет ингибирования этого процесса [11]. Важно и то, что в литературе отсутствуют сведения о формировании нанобиокомпозита, примененного в качестве систем доставки ЛВ, в том числе тканевого активатора плазминогена (ТАП), путем функционализации макромолекул фукоидана неорганическими наночастицами.

Активный таргетинг тканевого активатора плазминогена к целевому участку с помощью магнитного воздействия позволит осуществить его локальное действие, снизив системную токсичность препарата и риск возникновения ТАП-индуцированного кровоизлияния, а также повысить эффективность действия фермента. Кроме того, с одной стороны, фукоидан обладает тромболитическим действием [12], повышает активность ТАП [13] и стимулирует ТАП-индуцированный плазменный лизис тромба [14], основанный, во-первых, на большей аффинности и конкурентном связывании фукоидана с ингибитором инактивации плазминогена (ИАП1) [15], во-вторых, на изменении плазминогена в результате сопряжения с полисахаридом, что приводит к увеличению

чувствительности плазминогена к ТАП [16]. С другой стороны, иммобилизация ТАП позволит увеличить «кажущийся» молекулярный размер фермента, что приведет к увеличению периода полувыведения ТАП, а наличие фукоидана в применяемой для этого системе таргетинга позволит защитить ТАП от взаимодействия с ингибитором ИАП1, так как разработка системы доставки и протекции ТАП необходима в связи с коротким временем действия фермента в плазме крови. В то же время существующие системы доставки ТАП с использованием фукоидана ограничены в применении, так как основаны на пассивном таргетинге, где в качестве молекулярной мишени используется Р-селектин, к которому полисахарид проявляет высокую аффинность [17]. Фукоидан не обладает иммуногенной активностью, что выгодно отличает его от применяемых для этих целей антител. Однако фукоидан связывается с Р-селектином, образуемым на поверхности активированных тромбоцитов, которые локализуются помимо тромбов в области повреждений тканей, например в результате эрозии или отрыва атеросклеротической бляшки [18], активированной эндотелиальной ткани после острого ишемического инсульта [19].

Таким образом, наноконпозиты, формируемые на основе фукоидана, функционализированного магнетитом, не рассматривались и не были изучены ранее. Такие системы могут быть применимы как, обладающие синергизмом свойств полимерного и неорганического компонента, магнитоуправляемые средства активного таргетинга тромболитического агента с сохранением его биоэффекта и с низким уровнем содержания неорганических компонентов.

Цель исследования: разработка эффективной системы активного таргетинга клинически важного тромболитического фермента (тканевого активатора плазминогена) на основе низкомолекулярного фукоидана функционализированного наночастицами магнетита.

Задачи исследования:

– 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 биоконпозитов близких к наноразмерному ряду, с исследованием особенностей условий формирования и влияния соотношения компонентов процесса;

– протестировать полученные нанобиоконпозиты 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 нанобиоконпозитов при варьировании способа иммобилизации фермента.

Научная новизна. 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 нанобиоконпозита для таргетной доставки тромболитического агента. Обнаружена корреляция величины размера полученных конпозитов с количеством иммобилизованного фермента.

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

Научно-практическая значимость работы:

– оптимизирована система деполимеризации фукоидана путем систематического исследования условий высокоинтенсивной низкочастотной ультразвуковой обработки полисахарида в водной среде;

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

– осуществлена иммобилизация тромболитического агента на полученные носители путем ковалентного и нековалентного 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.

Положения, выносимые на защиту:

1) Разработана эффективная воспроизводимая методика контролируемой деполимеризации фукоидана с образованием наноразмерных частиц в водной среде.

2) Анализ биологических и физико-химических исследований продемонстрировал зависимость изменения размера, биологической активности и

степени сульфатированности от условий ультразвуковой деградации и состава среды.

3) Разработан метод получения эффективной магнитоуправляемой таргетной системы доставки ферментативного препарата на основе полученных наночастиц фукоидана, функционализированных магнетитом.

4) Предложен метод синтеза нанобиокомпозитов с иммобилизованным тромболитическим агентом на основе природного полимера, имеющих высокую степень загрузки и намагничиваемости, низкую степень полидисперсности.

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

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием комплекса взаимодополняющих физико-химических методов исследования с применением современного оборудования, в частности сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), динамического рассеивания света (ДРС), коагулологического анализа, спектрофлуориметрии, метода вибрационной магнитометрии, цитологических исследований, а также с применением апробированных экспериментальных методов и методик с высокой воспроизводимостью результатов экспериментов. Интерпретация результатов исследования основана на современных представлениях о физико-химических свойствах микро- и наночастиц.

Апробация работы. Результаты диссертации доложены на четырех региональных, одной всероссийской и двух 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», проводимая 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».

Структура диссертации. Диссертация изложена на 147 страницах машинописного текста и включает 35 рисунков, 7 таблиц, 3 формулы. Работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения и списка литературы, который включает 305 источников.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Фукоидан в разработке таргетных систем доставки лекарственных веществ: основные положения

1.1.1. Структурные особенности фукоидана

Фукоидан(ы) – это термин, используемый для обозначения группы высокосульфатированных полисахаридов. Изначально предполагалось, что этот полисахарид состоит лишь из остатков фукозы [20]. Однако позднее было установлено присутствие в структуре также различных количеств остатков глюкозы, маннозы, ксилозы [21] и глюкуроновой кислоты [22], а также наличие фукозы не только в более термодинамически выгодной форме α -L-фукопиранозы, но и в форме другого изомера – α -L-фукофуранозы (для фукоидана, выделенного из *Chordaria flagelliformis*) [23]. Можно выделить два наиболее часто встречаемых структурных типа: α -1 \rightarrow 3-связанные (А) и чередующиеся α -1 \rightarrow 3- и α -1 \rightarrow 4-связанные (В) линейные полисульфатированные фукозы с повторяющимися тетрасахаридными блоками, отличающимися по типу сульфатирования [24] (Рисунок 1).

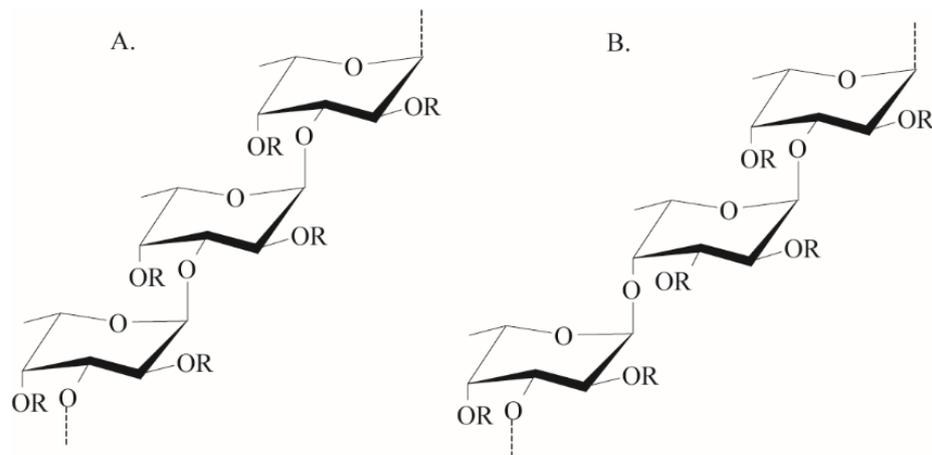


Рисунок 1 – Типы структурных скелетов фукоидана [25,26]

Первое упоминание о фукоидане встречается в 1913 г. работе Н. Kylin [27–29], который определяет этот полисахарид как «fucosan», а современный термин впервые встречается в работах W. McNeely «Фукоидан» [30] и В. Larsen «Сульфатированные полисахариды бурых водорослей» [31].

В литературе существует некоторая путаница в определениях понятий «фукоидан» и «фукан». Общим является представление о фуканах как собирательном термине, включающем и такие сульфатированные полисахариды, как гомофуканы и гетерофуканы (фукоиды или фукоиданы) [32]. Согласно ИЮПАК, высокосульфатированные полисахариды, главные цепи которых состоят из L-фукозы и содержащие менее 10 % других углеводных остатков, относят к высокосульфатированным фуканам [33]. При этом в работе О. Verneau [33] отмечается, что высокосульфатированные фуканы, выделенные из морских беспозвоночных (например, из панциря морского ежа или его икры [34], стенок тела морского огурца [35]), именуют просто фуканами, а высокосульфатированные фуканы, полученные из красных морских водорослей определяют как каррагинаны и галактаны [36], из бурых водорослей – фукоиданы. Поэтому под понятием «фукоидан» в данной работе понимается высокосульфатированный фукан, выделенный из бурых водорослей и имеющий гетерополимерное строение.

Фукоиданы в отличие от фуканов, выделенных из морских беспозвоночных и имеющих зачастую линейную гомогенную структуру, гетерогенны по своему составу, включают помимо нерегулярно расположенных сульфогрупп ацетильные группы, а также имеют разветвленную структуру, поэтому методы химического и структурного анализа не дают полной картины о строении полисахарида [37]. Вследствие этого точное соотношение между структурой и биологической активностью установить крайне сложно. Более того, существуют споры относительно структуры наиболее тщательно изученных представителей. Например, самым простым представителем фукоиданов является полисахарид, выделенный из *Fucus vesiculosus* [38]. Он является коммерчески доступным препаратом [39], и ежегодная стоимость продукции, связанной с производством или переработкой фукоидана, превышает 100 миллионов долларов США в год [40].

Так, изначально предполагалось, что этот полисахарид состоит из 4-О-сульфатированных остатков фукопиранозы, связанных α -(1→2) гликозидными связями [41,42]. Однако позднее было установлено наличие α -(1→3) гликозидных связей, причем 4-О-сульфатированные остатки фукопиранозы встречаются через 2–3 остатка фукозы [41,43].

Проблеме изучения структуры и строения фукоиданов посвящено множество исследований [44–49]. Так, структура фукоиданов, выделенных из *Laminaria saccharina*, *Clodosiphon okamuranus*, *Fucus vesiculosus*, охарактеризована в работах А. Cumashi, N. A. Ushakova, М.Е. Preobrazhenskaya и др. [25] и А. D. Holtkamp, S. Kelly, R. Ulber и др. [26]. Строение фукоидана детерминировано температурой извлечения, временем экстракции, рН экстрагента, а также видом и размером водорослей, местным климатом и другими факторами окружающей среды [38].

Макромолекулы фукоидана формируются в результате ферментативного синтеза. Анализ генома макроводорослей *Ectocarpus siliculosus* и *Saccharina sp.* продемонстрировал присутствие генов, которые кодируют ферменты, участвующие в биосинтезе фукоидана [50,51]. Некоторые ферменты, участвующие в образовании фукоидана, и основные направления синтеза показаны на Рисунке 2.

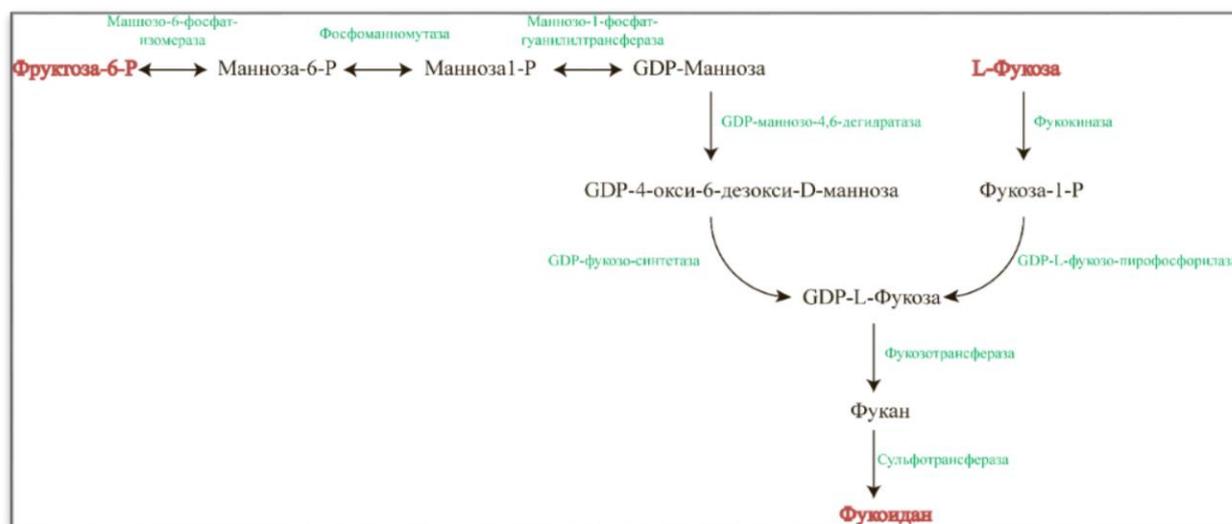


Рисунок 2 – Пути биосинтеза фукоидана в водорослях [50–52]

Как было отмечено, фукоиданы гетерогенны по своему составу, включают помимо нерегулярно расположенных сульфогрупп ацетильные группы, а также имеют разветвленную структуру и молекулярную массу, для высокомолекулярных представителей более 100 кДа, поэтому получить полную картину о строении полисахарида затруднительно [37]. Низкомолекулярные фукоиданы могут иметь молекулярную массу от 5 кДа. На сегодняшний день описана первичная структура фукоиданов, выделенных из *Fucus vesiculosus* [41,43], *Laminaria saccharina* [25], *Clodosiphon okamuranus* [25,26], построена молекулярная модель (для фукоидана, выделенного из *Turbinaria ornata* (Рисунок 3(а)) [47].

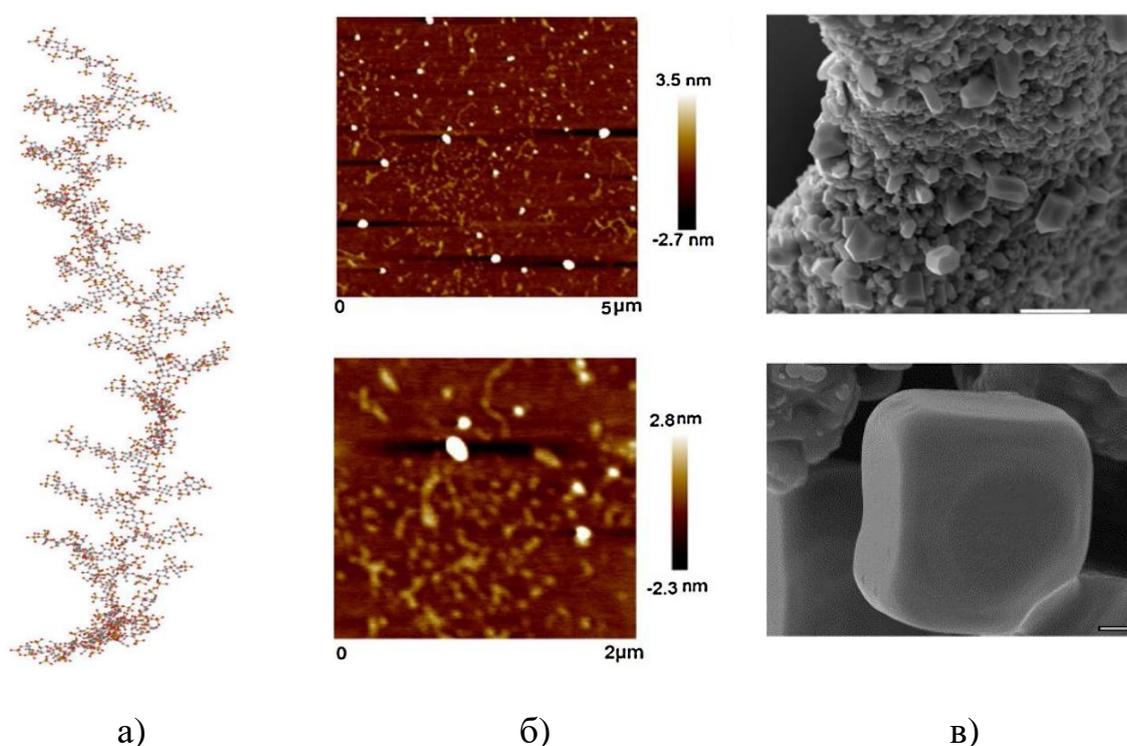


Рисунок 3 – Молекулярная модель фукоидана, выделенного из *Turbinaria ornata* (а) [47]; АСМ-изображение (б) [53] и РЭМ-изображение (в) фракции фукоидана [54]

Однако ультраструктура данного биополимера изучена слабо. С помощью атомно-силовой микроскопии установлено, что по макромолекулярной конфигурации низкомолекулярный полисахарид представляет собой сферолиты и

одинокими линейными цепями (Рисунок 3 (б)) [53], ширина которых может достигать 0,77 нм [55], в некоторых случаях 1 нм [53]. При более детальном изучении с помощью растровой эмиссионной микроскопии стало известно, что фукоидан может иметь хорошо организованную структуру с полигональной формой частиц (Рисунок 3 (в)), причем сами кристаллиты расположены линейно [54]. Десульфатированный сильноветвистый фукоидан, как и исходный, также принимает сфероподобную конформацию в воде [56].

1.1.2. Зависимость биологической активности фукоидана от структурных характеристик

Фукоиданы являются полифункциональными соединениями, обладающими рядом биологических действий, например противомикробным [57], противовоспалительным [58], антикоагулянтным [59,60], противовирусным, [61–63], иммуномодулирующим [64], противоопухолевым и противораковым [65,66], являются прямыми ингибиторами тромбина [67]. Фукоидан может быть использован для лечения многих заболеваний, таких как диабетическая ретинопатия, почечная и церебральная ишемии-реперфузии [68], в терапии онкологических заболеваний [69–71]. Перспективен для применения в качестве иммуномодулятора, причем более эффективен в форме индивидуального вещества, а не в коммерчески доступных смесях [72]. Иммуностимулирующее действие фукоидана осуществляется через влияние на макрофаги, Nk-киллеры, В-лимфоциты, дендритные клетки [73], повышая и гуморальный, и клеточный иммунитет. Все больше растет интерес к возможности его применения как адъюванта. Адъювантный эффект проявляется при пероральном введении после осуществления вакцинации благодаря иммуномодуляции [74] в результате всасывания в тонкой кишке, а включение в состав вакцины при инъекционном введении позволяет осуществить не только стимулирующее действие на иммунную систему, но и адсорбировать антиген, выступая в качестве его депо [75]. Показано, что использование фукоидана в комбинации с поверхностным антигеном вируса

гепатита В (HBs-AG) обнаружило его высокую адьювантную эффективность, превышающую таковую наиболее широко применяемого $Al(OH)_3$ [76]. Причем фукоидан не вызывает, но стимулирует образование противовоспалительных цитокинов (интерлейкина (IL)-10 TNF-а, IFN-g, IL-2) [77].

Фукоидан обладает противомикробным и противовоспалительным действием [78], способствует восстановлению повреждённой ткани благодаря взаимодействию с факторами роста (основным фактором роста фибробластов (bFGF) и трансформирующим фактором роста- β (TGF- β) [79–82], увеличивает скорость регенерации и реэпитализации [83], что дает ему существенные преимущества по сравнению с другими используемыми для этих целей полисахаридами. Может выступать как противораковый агент. Биополимер, имитируя гликопротеиновый лиганд Р-селектина 1 (PSGL-1) [84], обладает возможностью связывания с L- и Р-селектином [25], причем эта способность (связывать Р-селектин) сохраняется и при фиксации полисахарида в структуре наночастиц [85]. Имитируя молекулы адгезии CD15, полисахарид обладает возможностью связывания с гликопротеинами, экспонированными на поверхности активированного тромбоцитарного эндотелия [84,86]. Кроме того, полисахарид способен ингибировать интегрины, находящиеся на поверхности опухолевых клеток [87], что может привести к их апоптозу. В работе U. Roza, A. Stanislav, I. Irina и др. [88] подтверждено, что фукоидан, выделенный из бурой водоросли *Padina boryana*, подавляет рост колоний раковых клеток при концентрации выше 200 мкг/мл.

На биологическую активность фукоидана влияют ряд факторов, в том числе структурные особенности (степень сульфатирования, расположение сульфатных групп и т. д.), молекулярная масса, моносахаридный состав [41,89]. Так, низкомолекулярный фукоидан (7 ± 2 кДа) по сравнению с высокомолекулярным существенно увеличивает жизнеспособность клеток 7F2, стимулирует остеогенную дифференцировку *in vitro* и минерализацию костей *in vivo* [90], но не проявляет прямого антитромбинового действия [91].

Антикоагулянтная активность находится в прямой зависимости от количественного содержания остатков фукозы [92], степени полимеризации [93] и сульфатирования [91], с увеличением которых, а также с приближением конформации молекул полисахарида к правильной происходит повышение антикоагулянтной активности полисахарида [93]. Однако J. Wang с соавторами отмечает высокую антикоагулянтную и антиоксидантную активность также для низкомолекулярных фукоиданов [59]. Данное положение объясняется тем, что низкомолекулярные полисахариды имеют более высокую растворимость, что способствует их проникновению в клетку для выполнения определенных функций. В работе T. Zuo, X. Li, Y. Chang и др. [94] подтверждено, что с увеличением массы молекул степень их поглощения уменьшается и меняется эффективность фукоидана.

Одинаково эффективно проявили себя фукоиданы, имеющие разную степень сульфатированности и молекулярную массу в отношении ингибирования γ -амилазы. В исследовании использовали фукоидан *Fucus vesiculosus* (степень сульфатированности 15,5 %, молекулярная масса 2351 кДа) и *Ascophyllum nodosum* (20,6 % и 637 кДа соответственно). Но полностью десульфатированный полисахарид ингибирующим действием относительно α -амилазы не обладал [95].

В работе L. Chevolut, B. Mulloy, J. Ratiskol и др. [39] отмечается, что важно не только количество сульфогрупп, но и их расположение. В целом наличие 2-О-сульфатированных и 2,3-О-дисульфатированных остатков фукозы приводит к увеличению антикоагулянтной активности в большей степени, чем 4-О-сульфатированных [41]. Полученный с помощью ультразвуковой экстракции фукоидан, имеющий регулярное строение (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 4- α -L-фукан), а также сульфо- и ацетогруппу в С2 и С3 положении соответственно, показал высокую противоопухолевую активность в отношении клеток рака толстой кишки человека [96].

Иммуностимулирующая же функция фукоидана обусловлена присутствием в структуре не только сульфатных, но и ацетильных групп. Деацетилирование и десульфатирование привело к снижению активности. Так, десульфатированный

фукоидан привел к снижению выработки цитокинов BMDCs мыши на 35–70 % по сравнению с нативным фукоиданом и пролиферации макрофагов костного мозга (BMMs) (на 60–90 %). Секреция также значительно снизилась при применении деацетилированного фукоидана (на 50–60 % для BMDCs, 50–70 % для BMMs по сравнению с нативным фукоиданом) [97].

Исследование противовирусной активности фукоиданов выявило, что на ингибирование ВИЧ-1-инфекции не влияет степень сульфатированности и структура биополимеров (на примере фукоиданов, выделенных из *Sargassum mcclurei*, *Sargassum polycystum* и *Turbinara ornata*) [98]. Фукоиданы эффективно взаимодействуют с вирусом, препятствуя его проникновению в клетки-мишени. Найдено некоторое ингибирующее действие в отношении вируса герпеса (HSV-1), вируса Коксаки (CVB3) [99], а также в отношении вируса Ньюкасла [100] фракциями фукоидана, выделенными из *Dictyota dichotoma* и богатыми остатками галактозы.

На структурные особенности фукоиданов большое влияние оказывает способ извлечения, в свою очередь, способ извлечения и технология очистки зависят напрямую от целей применения полисахарида. Не во всех случаях существует необходимость получения химически чистых препаратов фукоидана. Так, Schneider с соавторами установили, что растворы фукозы, содержащие фукоидан, в большей степени тормозят развитие лимфомы Брекитта путем блокирования активации CXCR4-рецептора по сравнению с «чистым» полисахаридом. Но в обоих случаях, и для раствора полисахарида, и для раствора фукозы, содержащего фукоидан, активность была на порядок выше, чем у гепарина [101].

При выделении фукоидана происходит очистка от низкомолекулярных и высокомолекулярных соединений, таких как полисахариды (например, альгинатов), остаточные белки и вещества полифенольной природы [102]. Как отмечает А. М. Урванцева с соавторами, последние могут сшивать несколько молекул полисахарида между собой либо как нити окутывать их, поэтому авторами была предложена стадия очистки, при которой происходит разрушение побочных

взаимодействий с сохранением полисахаридной цепи путем обработки 30 % H_2O_2 с последующей ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе.

Немалое значение при получении полисахарида играет температура, при которой осуществляется процесс выделения. Так, повышение температуры от 90 до 150 °C и времени экстракции от 5 до 30 мин приводит к уменьшению молекулярной массы, степени сульфатированности, а также антиоксидантной активности фукоидана, выделенного из *Ascophyllum nodosum*. Более того, наблюдался различный моносахаридный состав: экстракция при 90 °C способствовала получению фукоидана с высоким содержанием остатков фукозы, а при 150 °C – увеличению количественного содержания остатков глюкуроновой кислоты [103].

В последние годы для извлечения биологически активных веществ из биомассы стал использоваться метод СВЧ-экстракции [104]. Этот способ экстракции заключается в обработке растительного сырья СВЧ-излучением, в результате чего внутриклеточная вода переходит в парообразное состояние, осмотическое давление увеличивается, клетка разрушается, а активные вещества через устьица выходят на поверхность. Этот метод имеет множество достоинств, в частности отсутствие необходимости внесения внешних растворителей, а, следовательно, и дальнейшей очистки от них. При введении дополнительных стадий данный метод применим для выделения сахаров и полисахаридов [105–107]. Более того, существуют исследования по применению метода СВЧ-экстракции для получения веществ из бурых водорослей [108], и лишь небольшая их часть рассматривает извлечение именно фукоидана [109]. Так выделение фукоидана с выходом до 38 % с помощью СВЧ-экстракции описано в работе Y. Yuan, D. J. Macquarrie [110]. Для этого бурая водоросль изначально обрабатывалась 80 % раствором этанола и лишь затем подвергалась микроволновому воздействию с последующим отделением альгината раствором CaCl_2 и осаждением фукоидана спиртом. Для нахождения оптимальных температурных и временных условий экстракцию проводили при варьировании температурного режима (90–150 °C) и времени (5–30 мин). Наблюдалась обратно пропорциональная зависимость температуры и степени сульфатированности полученного полисахарида.

Еще одним методом экстракции фукоиданов является ультразвуковая водная экстракция [96]. Такой способ извлечения позволяет сократить время экстракции с 6 ч (при «классическом методе») до 15 мин, проводить процесс при комнатной температуре (вместо требуемых 60 °С) и исключает необходимость проведения диализа с сохранением выхода продукта [96,111].

Выделение фукоидана возможно с помощью ферментативной экстракции, например при использовании папаина [112] экзо- и эндоферментов морских бактерий или моллюсков [113], и экстракции, основанной на формировании комплекса с дополнительно вводимым полисахаридом, например хитозаном. Разрушение такого комплекса осуществляется хлоридом натрия. Использование экстракции с помощью комплекса «фукоидан – хитозан» позволяет уменьшить количество используемого NaOH и сточных вод, что способствует снижению негативного воздействия на окружающую среду [70].

Таким образом, фукоиданы могут быть извлечены из бурых морских водорослей с помощью различных многоступенчатых процессов с применением химических, и/или физических, и/или ферментативных методов, очищены хроматографией, фракционированием и т. д. [22,26]. Наиболее приемлемыми являются способы с мягкими условиями обработки для сохранения нативных свойств фукоидана [103].

Как было рассмотрено, физико-химические характеристики, а также строение фукоидана зависят от ряда факторов: во многом от температуры извлечения, времени экстракции, pH экстрагента, а также вида и размера водорослей, местного климата и других факторов окружающей среды [38]. Последние условия влияют и на количественное содержание полисахарида. В зависимости от сезона сбора сырья содержание фукоиданов изменяется в 2–2,6 раза [114] и может достигать 20 %. Установлено, что среднее содержание фукоидана в *Fucus serratus*, *Fucus vesiculosus* и *Ascophyllum nodosum* составляет 6,0; 9,8 и 8,0 % соответственно. Причем более высокий процент выявлен для каждого вида сырья, собранного осенью и весной. В структуре также варьировалось содержание фукозы (от 18 % (время сбора – осень) до 28 % (время сбора – весна),

от 26 до 39 %, от 35 до 46 % соответственно) и сульфогрупп (от 30 до 40 %, от 9 до 35 % и от 6 до 22 % соответственно)[115], что, возможно, связано с их спорообразованием [116].

Таким образом, существует необходимость исследования взаимосвязи молекулярной массы, степени сульфатированности и других структурных характеристик и биологической активности. Однако остается важным и то, что выявленные соотношения соответствуют определенному, исследуемому фукоидану и не распространяются на другие фукоиданы [117,118].

Методы деполимеризации фукоидана

Как было отмечено выше, нативный фукоидан имеет высокую молекулярную массу, что приводит к низкой проницаемости через клеточную мембрану, снижению биодоступности, эффективности его действия, а соответственно, и клинического потенциала. Например, низкомолекулярный фукоидан по сравнению с высокомолекулярным существенно увеличивает жизнеспособность линии остеобластных клеток 7F2, способствует остеогенной дифференцировке *in vitro* и минерализации костей *in vivo* [90], имеет более высокую ранозаживляющую активность даже в самых низких концентрациях, используемых в исследовании (50 мг/мл) [119] по сравнению с нормальным фукоиданом. Подтверждена эффективность действия выделенного из *Laminaria japonica* низкомолекулярного фукоидана в отношении заболевания периферических артерий, основанного на изменении гиперреактивной агрегации тромбоцитов и улучшении реваскуляризации. Терапевтическое действие продемонстрировано на ишемии задних конечностей при сахарном диабете 2 типа у крыс [120]. Кроме того, влияние фукоидана в ангиогенезе также сильно зависит от молекулярной массы. Высокомолекулярный полисахарид обладает выраженной антиангиогенной активностью, а полисахарид с более низкой степенью полимеризации может выступать в качестве проангиогенного агента [118], т. е. низкомолекулярный фукоидан (5 кДа) за счет высокого сродства с цитокинами A5 и белками SDF-1

стимулирует пролиферацию клеток и увеличивает миграцию эндотелиальных клеток, усиливая образование сети микрососудов [121]. Это открывает перспективы использования низкомолекулярного фукоидана в методах лечения, связанных с восстановлением сосудов.

Открытие высокой биологической активности низкомолекулярного фукоидана требует поиска оптимального способа его деполимеризации с возможностью применения полисахарида в фармацевтических целях.

Вследствие чего существует два подхода: деполимеризация макромолекул нативного высокомолекулярного полисахарида, в том числе в момент его экстракции, или химический синтез как самого полисахарида, так и его миметиков.

Деполимеризация макромолекул фукоидана осуществима химическим (кислотным, основным) или ферментативным гидролизом [122], гамма-облучением [123,124], радикальным методом (например, с помощью H_2O_2 [125]), синергетически объединёнными методами (например, ультразвуковая или радиационная деструкции в присутствии H_2O_2 [126], гамма-облучением при ультразвуковом воздействии) и т. д. Однако в ходе деполимеризации изменяется и биологическая активность фукоидана, так как в результате побочных процессов происходит изменение в том числе таких структурных особенностей, как степень сульфатирования, расположение сульфатных групп, моносахаридный состав и т. д. [41,89].

Самым простым способом деполимеризации фукоидана является его гидротермальная обработка при $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ в герметичном флаконе в результате аутогидролиза. Изменение молекулярной массы регулируется варьированием времени обработки [117]. Для получения низкомолекулярного фукоидана с контролируемой молекулярной массой без десульфатации осуществляют гидротермальную обработку при $100\text{--}121\text{ }^{\circ}\text{C}$ с pH 5–6 [127].

Радикальная деполимеризация осуществима H_2O_2 в присутствии ацетата меди (II) и приводит к получению фракции с $7\pm 2\text{ кДа}$ [128]. Деградация с применением 0,5–3,0 % H_2O_2 позволяет устранить примеси в виде фенольных и терпеноидных соединений, влияющих на антиоксидантное и антипролиферативное

действие [129], и не приводит к существенным изменениям в качественном составе цепи фукоидана [125]. При этом скорость деградации увеличивается с ростом температуры от 60 до 100 °С и концентрации H_2O_2 с 0,15 до 4,5 %, однако повышение рН от 1 до 8 оказывает отрицательное влияние, что может быть связано с медленным образованием свободных радикалов в щелочных условиях [130].

Деполимеризация в условиях введения низких концентраций H_2O_2 (≤ 3 %) позволила получить фракции фукоидана от 4,9 до 21,4 кДа. Это оказалось более эффективно, чем применение концентрации пероксида водорода более 10 % (19,9–25,3 кДа), а также гидротермальной обработки (10,3–34,4 кДа) [117,129]. Важно, что во всех случаях наблюдается сохранение моносахаридного состава [117].

Для проведения кислотного гидролиза используются HCl , H_2SO_4 , пировиноградная, уксусная кислоты, что более подробно рассмотрено в обзоре Flórez-fernández с соавторами [131]. Кислотный гидролиз в 0,01 М HCl в течение 60 мин позволяет получить низкомолекулярный фукоидан 15–30 кДа из нативного (160 кДа) со степенью сульфатированности 8,2–33,2 % [132]. При этом менее устойчивыми к отщеплению являются остатки фукозы, так как их содержание в деполимеризованном полисахариде значительно снижается, в то время как молярное соотношение галактозы к маннозе в гидролизованном и нативном фукоидане остается одинаковым [133].

Недостатками кислотного гидролиза являются частичная или полная десульфатация фукоидана [126], частичное разрушение фукозы в структуре полисахарида [134]. Кроме того, методы химической деструкции, как правило, требуют применения высокой температуры, длительны во времени и требуют последующей очистки полученных продуктов. Ферментативный гидролиз позволяет исключить эти явления [122]. Для ферментативного гидролиза фукоиданов используют эндофукоиданазы, выделенные из морских моллюсков, которые требуют стабилизации [135]. Фукоиданаза катализирует расщепление фукоидана с образованием низкомолекулярных продуктов с выходом более 50 % [136]. Бактерия *Fucobacter marina* позволяет получить фракции с молекулярной массой 95,2 кДа и степенью сульфатированности 21 % [131,137]. Тем не менее

коммерчески доступной формы фермента, специфически лизирующего гликозидные связи цепи сульфатированных полисахаридов, на данный момент не разработано [125].

Ультразвуковая деградация характеризуется высокой скоростью разложения крупных молекул с узким распределением по молекулярной массе [138], позволяет получить водный раствор полимера без введения дополнительных стадий очистки. С другой стороны, сонолиз перспективен в получении наноразмерных материалов. Механизм ультразвуковой деструкции обусловлен формированием кавитационных пузырей, при схлопывании которых может возникать интенсивный локальный нагрев (около 5000 °С) и высокое давление (около 1000 атмосфер) [139]. В результате коллапса таких пузырей (Рисунок 4) высвобождается энергия, достаточная для разрыва химических связей в любых полимерных материалах [140]. Выделяют первичный, вторичный и физический сонохимический эффект. Первичный эффект связан со всеми процессами, протекающими в газовой фазе внутри пузыря, вторичный – в фазе раствора, и физический эффект вызван ударной волной, возникающей при практически адиаботичном коллапсе кавитационных пузырьков [141]. Предполагается, что разрыв полимерных цепей в результате сонолиза не носит рандомный характер, а осуществляется в середине молекулы, причем больший эффект – при воздействии низкочастотного ультразвука [142]. Также выявлено, что полисахариды быстрее деполимеризуются в разбавленных растворах, а также степень деградации возрастала с увеличением длительности ультразвукового воздействия [143] и с уменьшением степени разветвленности биополимера.

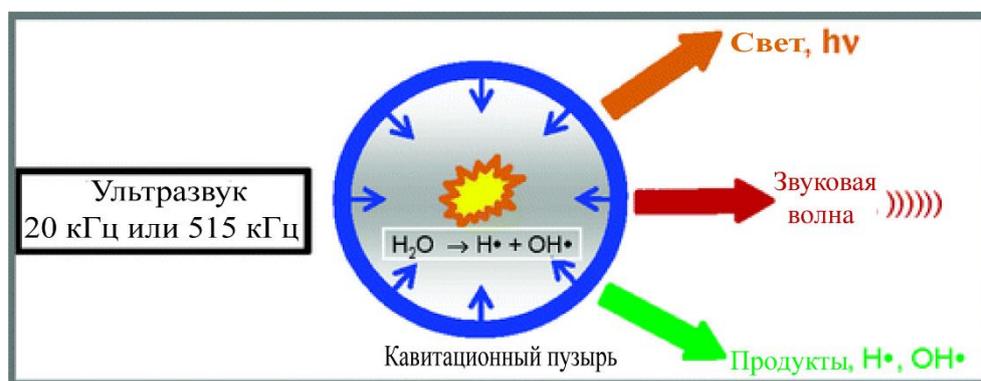


Рисунок 4 – Виды эмиссий при коллапсе кавитационного пузыря [144]

При сонохимической обработке в водной среде фукоидан, выделенный из морского огурца, при интенсивности 508 Вт/см^2 и частоте 21–25 кГц сохранил повторяющиеся линейные тетрасахаридные блоки лишь с частичным разрушением несультатированных звеньев фукозы [145]. После 220 мин такой обработки средняя молекулярная масса фукоидана снизилась с 338 до 91 кДа. Деполимеризация фукоидана из *S. fulvellum* высокоинтенсивной низкочастотной обработкой (25 кГц, 200 Вт) в присутствии H_2O_2 имела радикальный механизм. Полученный продукт сохранил структурные особенности исходного биополимера [126]. ИК-спектры обработанного фукоидана были идентичны спектру нативного полисахарида, за исключением максимума пика полосы поглощения растяжения связи $\text{C}=\text{O}$ (1730 см^{-1}) и диапазона асимметричных валентных колебаний CO -связей карбоксильной группы (1630 см^{-1}).

Таким образом, ультразвуковая деструкция является одним из простых и эффективных методов деполимеризации полисахарида.

1.1.3. Фукоидан как компонент при создании таргетных систем доставки лекарственных веществ

На сегодняшний день существует множество направлений приложения фукоидана в медицинской и фармацевтической промышленности. Основные векторы исследования связаны с применением его в разработке лекарственных препаратов для противораковой терапии, применением как гепариноподобного

вещества, а также как медицинского средства и материала, применимых в диагностических целях и/или в качестве системы доставки лекарственных средств (Рисунок 5) [146].

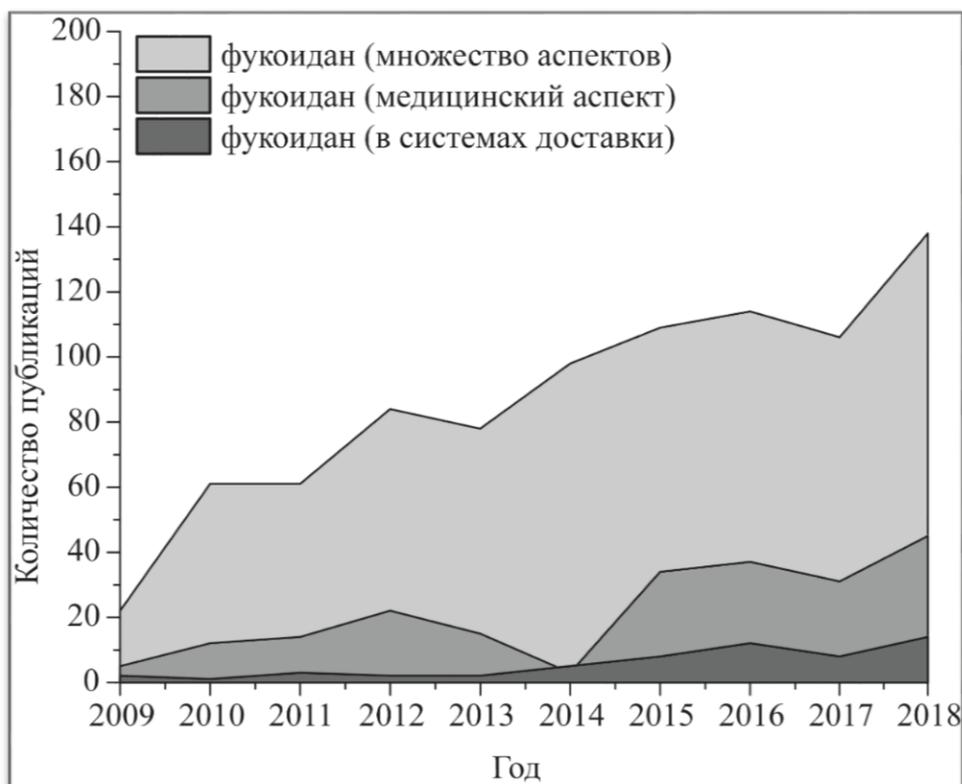


Рисунок 5 – Статистические данные о количестве публикаций, связанных с исследованием фукоидана (БД: Pub Med, дата обращения: 24.03.2019)

Благодаря использованию таргетных систем доставки наблюдается усиление терапевтического эффекта фармацевтических средств, улучшение их фармакокинетического профиля, увеличение биодоступности с одновременным снижением побочного действия, а также повышение их химической и конформационной стабильности. Для адресной системы доставки лекарственных средств могут быть сформированы системы с контролируемым высвобождением веществ [147]. Само высвобождение лекарственного вещества осуществимо путем диффузии и/или эрозии и/или биodeградации носителя [148], что зависит от молекулярной массы иммобилизуемого агента. Так, для крупных молекул (белки, ДНК и т. д.) характерно высвобождение, сопровождаемое биodeградацией

полимера оболочки, для малых молекул – диффузией. Сама же скорость высвобождения лекарственного компонента контролируется балансом между скоростью высвобождения лекарственного средства через градиент концентраций, в некоторых случаях – скоростью релаксации материала, используемого при формировании таких систем, в результате диффузионных процессов [149], а также пористостью и толщиной стенки частиц-носителей.

Основными видами систем таргетинга, созданных с использованием фукоидана, являются объекты: формируемые за счет сил электростатического притяжения разноименно заряженных полиэлектролитов (послойная адсорбция, полиэлектролитные комплексы) [150], эмульсии [151], металл-полимерные комплексы [152], а также образованные с помощью методов химической сшивки. Однако для последнего в связи с высокой растворимостью фукоидана и низкой способностью к гелеобразованию зачастую осуществляется его предварительная физическая/химическая модификация [30].

Системы доставки, созданные за счет взаимодействия макромолекул хитозана и фукоидана, были впервые описаны в работе A. D. Sezer, J. Akbuğa [153] и определены как «фукосферы». Движущей силой образования таких конъюгатов является электростатическое взаимодействие между макромолекулами, на которое могут влиять как внешние (соотношение биополимеров, pH системы, ионная сила раствора и температура), так и внутренние (молекулярный вес и структура, суммарный заряд и гибкости цепей биополимеров) факторы [154]. Так, взаимодействие молекул фукоидана и хитозана при pH 2 приводит к формированию комплексов с высоким содержанием свободных сульфатных групп двух видов: малостабильных с низкой плотностью сшивания и стабильных с высокой плотностью заряда. С повышением pH до 6 число свободных сульфатных групп уменьшается и формируются стабильные, с высокой плотностью сшивания и высоким выходом частицы [155]. Диаметр фукосфер, как правило, составляет 230–250 нм, иногда 110–140 нм (Рисунок 6) [6]. Для выравнивания распределения по размерам, придания формы микросферы осуществляют обработку ультразвуком [156]. Частицы стабильны в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с pH ниже 6,5 [157],

в растворе 20 % трегалозы, а конъюгаты с весовым соотношением фукоидан:хитозан = 1:1 при значении рН 2,5 [158]. В нормальных же физиологических условиях (рН выше 6,5), происходит разрушение частиц в связи с депротонированием аминогрупп хитозана [159], что является их основным недостатком.

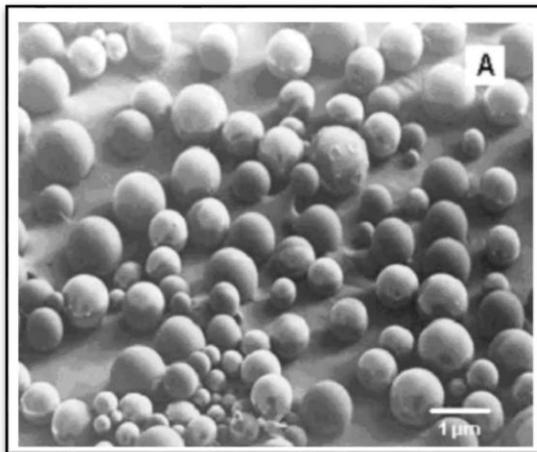


Рисунок 6 – СЭМ-изображение фукофер [153]

Фукоферы малого размера могут быть использованы для решения проблемы перорального введения терапевтических белков благодаря биodeградируемости и биосовместимости используемых полимеров. В качестве стандартных белков были использованы БСА, инсулин, овальбумин, показавшие высокую эффективность инкапсуляции [160]. Наибольшая эффективность инкапсуляции пептидных структур (89,5 %) наблюдалась при использовании раствора фукоидана с концентрацией 2,5 %, где размер частиц колеблется в пределах 0,61–1,28 мкм [153].

Фукоферы проявили себя перспективными матрицами при рассмотрении систем доставки плазмидной ДНК, кодирующей GM-CSF [5,161]. Степень инкапсуляции зависит от молекулярной массы используемых полисахаридов и варьируется от 84,2 до 94,7 % при размере частиц 151–401 нм. Полное высвобождение плазмидной ДНК наблюдалось через 90–140 дней. Контроль за целостностью молекулы ДНК осуществлялся с помощью электрофореза в агарозном геле, где изменений не наблюдалось [161].

Таким образом, эффективность инкапсуляции фукоферами, их размер зависит от соотношения используемых полисахаридов, а также их молекулярной массы, а использование фукоидана позволяет увеличить инкапсулирующую эффективность, что было доказано с использованием офлоксацина [162].

Однако фукофферы имеют жесткую структуру вследствие доминирования на поверхности частиц положительно заряженного хитозана, поэтому малоприспособлены для доставки веществ через стенку клеток. Решение этой проблемы возможно благодаря введению дополнительных компонентов.

Внесение хондроитинсульфата позволило создать биосовместимые частицы, способные к проницаемости через монослой клеток Caco-2 и кишечный эпителий, что открывает широкие перспективы перорального введения таких систем [163]. Интересно и то, что фукоидан в данных частицах проявляет большую антикоагулянтную активность относительно фукоидана в свободной форме в той же концентрации. Возможно, это происходит вследствие того, что в растворе полисахарид может изменять конформацию, меняя активность (в данном случае снижая её), в то время как в наноструктурах конформация фиксирована и осуществляется более эффективное взаимодействие [164]. С этой точки зрения da Silva с соавторами объясняет и изменение влияния на свертываемость крови. Так, фукоидан, находящийся в наночастицах «фукоидан – хитозан – хондроитинсульфат», приводит к уменьшению свертываемости до 2 раз даже при низкой концентрации частиц [163]. Тиолирование фукоидана и модификация хитозана аргенином позволяют формировать в результате самосборки наночастицы для усиления транспорта как гидрофильных, так и гидрофобных молекул (на примере декстрана и куркумина) [165].

Модификацией способа получения систем доставки за счет сил электростатического взаимодействия является формирование путем послойной адсорбции на темплатах различной природы (LbL-метод). После удаления матрицы образуются полые многослойные микро- или нанокапсулы с сохранением формы и незначительным изменением их размера. Так, в работе A. C. Pinheiro, A. I. Bourbon, M. A. Cerqueira и др. [166] нанокапсулы были получены адсорбцией 10 слоев

хитозан/фукоидан на наночастицах полистирола. С помощью сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии было установлено уменьшение размера и сохранение сферической структуры частиц после удаления ядра. Системы поли-L-орнитин/фукоидан, сформированные на микрочастицах карбоната кальция, инкапсулировали доксорубин с высокой степенью загрузки, 69,7 % [167], а на микрочастицах поли (лактид-со-гликолида) – 42,5 % [168].

Кроме того, применимо использование сшивающих агентов, где самыми простыми являются ионы Ca^{2+} . Ионная сшивка фукоидана и О-карбоксиметилхитозана с помощью Ca^{2+} позволяет формировать pH чувствительные наночастицы размером 100–200 нм с инкапсулирующей способностью 92,8 %. В качестве активного компонента использовали куркумин. Потенциально эти частицы применимы для пероральной доставки куркумина, а также других фенолов и терпенов [169].

Еще одной схемой формирования систем доставки с применением фукоидана является метод распылительной сушки. Он позволяет получать микрочастицы на основе фукоидана, применимые для ингаляционного способа доставки низкомолекулярных противотуберкулезных препаратов [170]. Однако распылительная сушка наряду с достоинствами (отсутствие токсических растворителей, легкость формирования и т. д.) имеет свои недостатки. Для приготовления такого рода полиэлектролитных комплексов используются кислые растворы полисахаридов, что подходит не всем капсулируемым биологически активным компонентам. Кроме того, сушка распылением может привести к денатурации включаемых компонентов, а также широкому диапазону разброса размеров полученных частиц. С помощью коаксиальной электрораспылительной сушки возможно получить гелеобразные композитные хитозан-фукоидановые частицы с высокой степенью загрузки (на примере липоевой кислоты) с варьированием размера от 5 до 9 μm [171,172].

Синтез носителей на основе фукоидана возможен также в результате самоорганизации молекул полисахарида в растворе, для этого полисахарид подвергают химической модификации, например ацетилированию, в результате

чего образуются частицы диаметром около 140 нм, которые возможно использовать как систему доставки доксорубицина. Эффективность загрузки и высвобождения модельным лекарственным препаратом составила 71,1 и 3,6 %, соответственно. Полное высвобождение средства наблюдалось через 5 дней, что делает перспективным применение таких систем при лечении раковых заболеваний в сочетании иммунно- и химиотерапии [173].

Функционализация поверхности нанобъектов формированием фукоидансодержащего покрытия

Применение фукоидана в таргетинге может быть осуществлено через функционализацию поверхности наночастиц различной природы. Так, наночастицы биомагнетиков, поверхность которых функционализирована фукоиданом, могут выступать в роли миметиков лейкоцитов; контрастного вещества для молекулярной визуализации при обследовании с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) для диагностики аневризмы брюшной аорты или любого другого артериального заболевания, связанного с экспрессией Р-селектина [174], и для усиления иммунотерапии [175].

Функционализация фукоиданом осуществима несколькими способами:

– формирование покрытия на поверхности готовых нанобъектов. Полисахарид может использоваться при последовательном нанесении в комбинации с другим биополимером (например, декстраном [174], карбоксиметилдекстраном [18,176], хитозаном [177], гидрохлорид полиаллиламиноом [178]), при этом возможна первоначальная химическая модификация биополимера, например аминирование [18,176]. Покрытие может быть нанесено на наночастицы серебра [179], золота, поли(изо-бутилакрилата) [180], сульфида меди [178], оксида железа [181], комплексных частиц оксида железа/диоксида кремния [182].

Фукоидан на поверхности частиц способствует их связыванию с активированными тромбоцитами, а также проявляет антиагрегатные свойства, что

не позволяет слипаться сформированным частицам. Покрытые таким образом наночастицы оксида железа потенциально применимы в качестве контрастного вещества T2 в МРТ и для визуализации активированных тромбоцитов [18]. Так, в работе М. Suzuki, L. Bachelet-Violette, F. Rouzet и др. [176] внутрипросветный тромб аневризмы крыс был идентифицирован с помощью МРТ через час после введения ультраразмерных гамма- Fe_2O_3 частиц, поверхность которых была функционализирована фукоиданом. При этом применение частиц оксида железа без нанесенного фукоидана аневризмы не выявило. В отсутствие тромба сигнал не обнаружен. Присутствие молекул фукоидана на поверхности наночастиц оксида железа было доказано с помощью инфракрасной Фурье-спектроскопии. Наночастицы ZnO, легированные железом, позволяют проводить МРТ и оптическую визуализацию с помощью флуоресценции при ультрафиолетовом возбуждении, а благодаря фукоидановому покрытию возможно обнаруживать ранний тромбоз вследствие связывания с активированными тромбоцитами [183].

Покрытие фукоиданом наностержней золота позволяет осуществить конъюгацию с моноклональными антителами против рецептора эпидермального фактора роста и рассматривать такую систему в качестве новых фототермических абляционных агентов для нанотераностиков рака (Рисунок 7) [184], покрытие наночастиц MnO_2 – открывает их терапевтический потенциал в лечении радиорезистентного рака поджелудочной железы [185], наночастиц хитозана с загруженным ципрофлоксацином – показало повышенную антибактериальную активность таких частиц в отношении биопленки сальмонеллы [186];

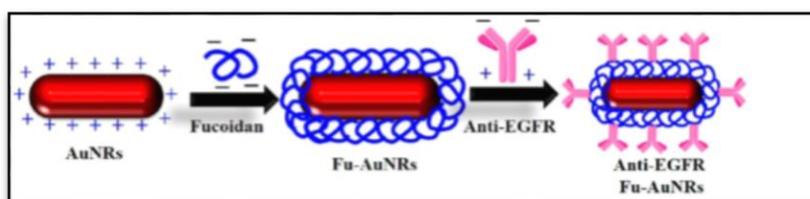


Рисунок 7 – Схематическое изображение покрытия наностержней золота с последующей конъюгацией с анти-EGFR моноклональными антителами

– функционализация в момент синтеза наночастиц. Фукоидан может быть нанесен на различные частицы, в том числе и в момент их получения, например методом анион-эмульсионной, радикальной полимеризации, с использованием ox-red инициаторов [81, 146,180], причем количество включенного фукоидана в образуемую им оболочку зависит от способа полимеризации. Покрытие частиц фукоиданом приводит к увеличению стабильности полученных систем, а также позволяет им взаимодействовать с макрофагами, что, в свою очередь, может быть подвергнуто модуляции [180]. Таким методом осуществляется также функционализация полимерных полисахарид-поли(изо-бутилцианоакрилат) наночастиц [187], которые возможно применять самостоятельно как ультразвуковой контрастный агент для визуализации венозного тромба [136] или как носитель. Так, последующая загрузка таких частиц, например рекомбинантным тканевым активатором плазминогена (ТАП), приводит к возможности их использования для таргетного тромболизиса [17]. В присутствии фукоидана возможно получение наночастиц серебра методами «зеленой химии», а последующее нанесение молекул хитозана позволяет сформировать на поверхности комплексное покрытие фукоидан/хитозан [177]. В присутствии фукоидана также были получены наночастицы золота, покрытые полисахаридом с контролируемым распределением по размерам [188].

Нанокмозиты на основе фукоидана для медицинского применения

Изначально фукоидан нашел широкое применение как антикоагулянтный агент благодаря некоторым структурным сходствам с гепарином, в частности связанным с наличием сульфогрупп. Однако позднее эта структурная особенность обеспечила фукоидану ключевую роль в тканевой инженерии за счет способности регулировать ангиогенез, выступать в качестве миметика гликозаминогликанов, способствуя остеогенной дифференцировке и минерализации костей. Так фукоидан способствует регенерации костной ткани за счет увеличения экспрессии [154] и дифференциации остеобластов [3], экспрессии остеопонтина, коллагена,

остеокальцина; повышению уровня щелочной фосфатазы [190]; индукции пролиферации мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека. Поэтому фукоидан активно используется в разработках новых направлений исследования проблемы создания искусственной костной ткани. Композит фукоидан/поли(ϵ -капролактона) имеет большой потенциал в разработках, направленных на повышение регенерации костной ткани. После 14 дней культивирования остеобластов на поверхности подложки из композита фукоидан/поли(ϵ -капролактона), увеличилась их пролиферация и минерализация клеточных оболочек до 30 % по сравнению с клетками на подложке из поли(ϵ -капролактона), не содержащей полисахарид [191]. Формирование композита возможно в виде пряжей путем электрораспыления [192]. Для контроля высвобождения фукоидана в композит фукоидан/поли(ϵ -капролактона) может быть введен альгинат [193].

Значительные результаты костеобразования на модели кролика были выявлены для нанокompозита гидроксиапатит/фукоидан [194] *in vitro* для систем на основе желатина, содержащих фукоидан и MTN-пептид [195], и нанокompозитных скаффолдов фосфат кальция/хитозан /фукоидан [196], высокая биосовместимость определена для композита хитозан/наногидроксиапатит/фукоидан [197] и N,O-карбоксиметилхитозан/фукоидан/гидроксиапатит [198]. Внесение фукоидана в уже исследованные композитные системы позволяет увеличить способность к адсорбции белка и минерализации в два раза по сравнению с исходными формами [199], что свидетельствует об усилении активности композита в отношении регенерации костной ткани.

Существуют также работы, направленные на создание нанотераностических агентов с применением фукоидана. Композит, содержащий наночастицы золота и загруженный доксирубицином Dox-Fu@AuNPs, показал высокую цитотоксичность в отношении клеток опухоли кроличьего глаза *in vivo* в результате синергетического действия химиотерапии и фототермии. Рецидива не наблюдалось.

1.2. Проблема разработки и применения систем доставки тканевого активатора плазминогена

Основными тромботическими явлениями в медицинской практике являются ишемический инсульт, инфаркт миокарда, тромбоэмболия легочной артерии, венозный тромбоз [200]. Кроме того, проблема тромбоза проявляется при введении устройств, контактирующих с кровью, например сосудистых трансплантатов, сердечных клапанов, коронарных стентов и т. д. [201].

Тромб представляет собой сгусток, состоящий из стабилизированного фибрина с включенными кровяными клетками (Рисунок 8). Структура фибринового сгустка представляет собой трехмерную нитевидную сеть [202]. Формирование тромба вызывается активацией тромбоцитов, что приводит к изменению их формы, выработке факторов коагуляции, последующей агрегации и образованию фибриновых нитей [203].

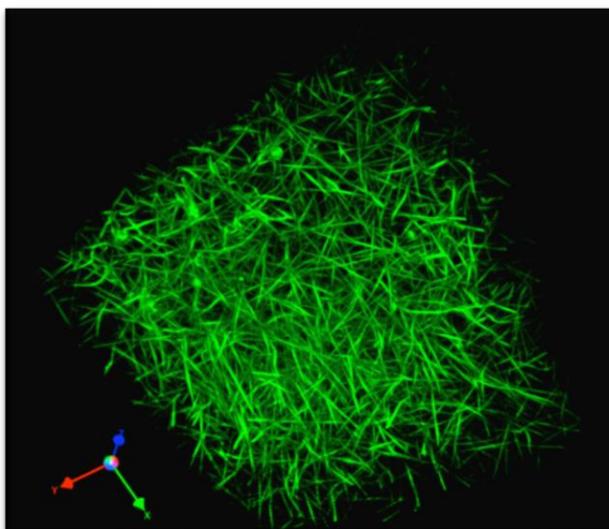


Рисунок 8 – Трехмерная реконструкция гидратированной фибриновой сети, полученной с помощью флуоресцентной конфокальной микроскопии [204]

Существует две стратегии в борьбе с тромбозом: введение веществ, ингибирующих фибриногенез (например, гепарин) или индуцирующих

фибринолиз (путем активации плазминогена или использования пептидаз, расщепляющих фибрин) [205]. Фибринолиз сгустка осуществим с помощью протеолитического фермента – плазмина, который существует в неактивной форме – форме плазминогена. В медицинской практике в качестве активаторов плазминогена используют либо рекомбинантные формы тканевого активатора плазминогена, либо бактериальные тромболитики (стрептокиназа).

Самым распространенным подходом в тромболитической терапии является использование в качестве тромболитического агента рекомбинантного тканевого активатора плазминогена, который эффективно лизирует тромбы при условии своевременного введения в рамках терапевтического окна [206]. Под его воздействием осуществляется фибринолиз за счет катализирования перехода плазминогена в плазмин [207]. Но, несмотря на эффективность данного метода, существуют некоторые проблемы в его применении. Так, например, для своевременного восстановления кровотока путем повышения эффективного растворения тромба производится увеличение терапевтической дозы в связи с тем, что при внутривенном введении действие ТАП инактивируется ингибитором активации плазминогена (ИАП1) и для решения этой проблемы ТАП вводится в количестве, превышающем концентрацию ИАП1. Однако высокие терапевтические дозы могут привести к повреждениям сосудов и внутренних органов, фибринолитическому кровотечению в результате опосредованного действия ТАП на интактный фибрин [208], так как при повышении дозировки ТАП оказывает ферментативное воздействие не только на плазминоген, фиксированный в тромбе, но и на свободно циркулирующий в кровотоке [209], и как следствие возникают гематоосложнения, которые в клинической практике встречаются в 20 % случаев [210]. Поэтому проблема локального повышения концентрации ТАП с очаговой активацией тромболитической активности непосредственно в месте тромбинового сгустка является актуальной. Однако существующие катеторные, или эндоваскулярные методы местной доставки ТАП являются технически сложными и дорогостоящими [211], выполнимы

высококвалифицированными неврологами, а также применимы только к «легкодоступным» тромбам [17].

Таким образом, увеличение селективности действия ТАП со снижением побочного воздействия осуществимо через разработку эффективного способа доставки. В качестве носителей и средств протекции ТАП могут быть использованы микрочастицы, липосомы, металлосодержащие и кремневые частицы. Применение липосом на основе фосфотидилхолина, стабилизированных ПЭГ, позволило увеличить время полувыведения фермента в 21 раз по сравнению с ТАП в свободной форме [212], т. е. увеличить время циркуляции ТАП в кровотоке. Однако низкая стабильность и эффективность нацеливания липосомальных систем ограничивают их применение в клинических условиях [212,213].

В общем случае инкапсуляция фибринолитического агента позволяет осуществить проникновение фермента в более глубокие слои окклюзионного сгустка крови, в результате чего осуществляется более полный лизис тромба, а не только на границе раздела фаз фибриновый сгусток – кровь [214]. Однако в то же время вследствие инкапсуляции возникают стерические затруднения взаимодействия фермента с фибрином и увеличение терапевтического эффекта фермента при использовании микро- и наноразмерных систем доставки, что более обусловлено блокированием ингибирующего действия ИАП1 ферментов и улучшением проникновения в кровяные сгустки при наличии внешнего воздействия. Например, комбинация адресной доставки ТАП с ультразвуковым воздействием предполагает усиление диффузии фермента в фибриновый сгусток и, как следствие, улучшение тромболиза [215,216]. Установлено, что такое синергетическое воздействие стимулирует активность ТАП [217], однако остается невыясненным влияние ультразвукового воздействия на целостность белковой структуры.

Существует несколько способов иммобилизации фермента, в том числе инкапсуляция, физическая адсорбция на поверхности носителя и ковалентное взаимодействие с ней [218]. При этом последний способ может привести к

увеличению стабильности иммобилизируемого фермента, но с одновременным снижением эффективности его действия за счет блокирования сайта связывания или конформационных ограничений [218,219]. Иммобилизацию с помощью ковалентных связей позволяет осуществить широкий спектр веществ, варьируемых в зависимости от pH среды, температурных режимов, свойств матрицы [220]. Так, иммобилизация рекомбинантного ТАП на силанизированный магнетит осуществима с помощью N-гидроксисульфосукцинимидом [221]. Инкапсуляция может быть осуществлена, например, в микросферы поли(лактид-со-гликолида) [210]. Кроме того, для иммобилизации могут быть использованы в качестве магнитных носителей не только магнетит (Fe_3O_4), одним из достоинств которого является отсутствие остаточного магнетизма [222], но и маггемит ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), при этом для повышения коллоидной стабильности и биосовместимости их предварительно покрывают оболочкой органической или неорганической природы [223]. Использование магнитных никелевых наностержней приводит к увеличению эффективности действия ТАП, однако вследствие своей токсичности они не могут применяться в клинических условиях [8]. Данные по разработке некоторых систем доставки ТАП представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Данные по разработке некоторых систем доставки ТАП

Состав носителя	Способ включения ТАП	Размер частиц, нм	Степень включения, %	Ссылка
<i>Липосомы</i>				
Фосфатидилхолин/холестерин-3-сульфат натрия/ 2000 (DSPE-PEG 2000)	Инкапсуляция	112,9±6,2	21	[82]
		145	-	[224]
DPPC/DSPE-PEG 2000/холестерол + наночастицы магнетита (термочувствительные)	Инкапсуляция	443	-	[225]

Состав носителя	Способ включения ТАП	Размер частиц, нм	Степень включения, %	Ссылка
Полимерные носители				
Микросферы PLGA покрытые: хитозаном	Инкапсуляция	260–320	65,5±0,5	[210]
хитозан/GRGD пептид	Инкапсуляция	265,2±7,4	–	[226]
Эритроцит-подобные структуры PLGA/поли(этиленгликоль)диакрилат	Иммобилизация	803±15	–	[200]
Полисахарид-поли(изобутилцианоакрилатные) наночастицы	Адсорбция	136±4	–	[17]
Zn ²⁺ - желатиновые наночастицы	Иммобилизация	100	–	[227]
ПЭГ/поли(ε-капролактон)	Иммобилизация за счет образования амидных связей	129±3,8	54,6±2,8	[228]
Неорганические носители				
Наностержни магнетита	Ковалентно, с помощью глутарового альдегида	l = 1,02±0,03 μм; d = 300 нм	6 масс. %	[229]
		l = 1,3±0,2 μм; d = 0,5±0,1 μм	12,9	[213]
Наночастицы магнетита, покрытые хитозаном	Инкапсуляция	357,5±15,7	82,6	[230, 231]
Наночастицы магнетита, покрытые декстраном	Адсорбция	166±4	91±4	[232]
	Ковалентно, с помощью EDC и NHS	170±6	98±3	

Состав носителя	Способ включения ТАП	Размер частиц, нм	Степень включения, %	Ссылка
<i>Неорганические носители</i>				
Наночастицы силанизированного магнетита	Ковалентно, с помощью sulfo-NHS	250–365	52–63	[221]
	Ковалентно, с помощью 3-аминопропил-триэтоксисилана	200,5±3,1	До 94	[233]
Наночастицы магнетита, покрытые полиакриловой кислотой	Ковалентно, посредством образования карбодиимидопосредованной амидной связи	46±11	74,7 мг	[222]
Наночастицы магнетита, покрытые поли(акриловой кислотой-со-малеиновой кислотой)	Адсорбция Ковалентно, с помощью этилкарбодиимид гидрохлорида и NHS	130–250	47,7±0,4	[234]
			98,6±0,8	
Кластерные нанокубы Fe ₃ O ₄ , покрытые БСА	Иммобилизация в покрытие	150	66±5,6	[235]
Наночастицы магнетита/PLGA/хитозан/циклический аргининглицин-аспарагиновый пептид	Инкапсуляция	395,2±12,2	63,7±1,5	[236]

Еще одним методом, позволяющим увеличить эффективность действия ТАП, является использование тромб-направленного вектора, в качестве которого могут выступать полисахариды. Благодаря свойствам, рассмотренным ранее, для этих

целей применим и фукоидан. Эксперименты *in vivo* продемонстрировали его положительное влияние на тромболитический процесс при использовании в качестве вектора для ТАП с усилением тромболитической активности фермента путем простой ассоциации с вектором и без радикальной химической модификации структуры полисахарида [86].

Таким образом, магнитные носители позволяют повышать количество частиц в заданной области при локальном воздействии внешнего магнитного поля, что является важным свойством при разработке систем селективного тромболитического действия.

Существующие методы защиты ТАП направлены на подавление его ферментативной активности в кровяном русле и предполагают его активацию при взаимодействии с тромбином. Маскировка ТАП осуществима с помощью БСА через линкерный пептид, расщепляемый при контакте с тромбином. Данная конструкция (Рисунок 9) делает ТАП недоступным для циркулирующего плазминогена в кровотоке, при этом накопление на поверхности тромба осуществляется за счет имеющегося в конструкции СТγF пептида, связываемого с интегрином GPIIb/IIIa, экспрессируемым неактивированными тромбоцитами [237].

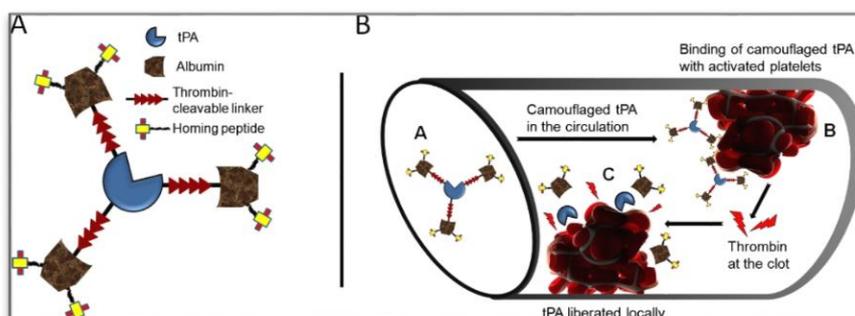


Рисунок 9 – Способ маскировки ТАП:

- А) – конструкция замаскированного тканевого активатора плазминогена;
 В) – предполагаемый механизм действия [237]

С учетом вышеизложенного, решение проблемы создания системы доставки ТАП, приводящей к минимуму побочного действия, является необходимым, и, в соответствии с последними исследованиями, полимерные носители в сочетании с магнитным воздействием могут увеличить эффективность и безопасность ТАП как тромболитического агента.

Выводы:

– фукоидан получают из возобновляемого источника биологически активных веществ – бурых водорослей, имеющих широкое распространение;

– фукоидан обладает широким спектром биологической активности и является перспективным полимером для разработки материалов медицинского и фармацевтического назначения, но свойства полисахарида зависят от структурных характеристик полисахарида, определяемых группой факторов (место произрастания сырья, время его сбора, способ извлечения и т. д.), и требуют подбора оптимального метода получения его низкомолекулярных фракций;

– полисахарид применим в разработке носителей как для пассивного, так как не проявляет иммуногенную активность, что выгодно его отличает от применяемых для этих целей антител, так и активного таргетинга. Однако высокий молекулярный вес ограничивает его использование. Существующие методы деградации имеют различную эффективность и ряд недостатков, в их числе изменения в качественном составе цепи;

– необходима разработка системы доставки тромболитического агента для локального повышения концентрации ТАП с очаговой активацией тромболитической активности непосредственно в месте тромбинового сгустка, увеличения селективности действия ТАП со снижением побочного воздействия. Существуют различные подходы к созданию таких систем, где в качестве носителей и средств протекции тромболитического агента могут быть использованы микрочастицы, липосомы, металлосодержащие и кремневые частицы, однако на сегодняшний день эффективного способа доставки ТАП не разработано.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Методики получения материалов

2.1.1. Выделение очищенного фукоидана

В ходе работы был использован фукоидан, выделенный из *Fucus vesiculosus* по методике, описанной в работе Т. N. Zvyagintseva, N. M. Shevchenko, I. V. Popivnich и др. [238], с некоторыми изменениями.

К тонкоизмельченной водоросли вносили экстрагент в соотношении 1:25 и перемешивали в течение 3 ч при 60 °С. В качестве экстрагента выступала дистиллированная вода (60 °С), содержащая 0,01 М CaCl₂ [239]. CaCl₂ был внесен для удаления альгината. Экстракт осаждали 5 % спиртом, последующую очистку производили в соответствии с работой А. М. Урванцева, И. Ю. Бакунина, Н. Ю. Ким и др. [102]. Полученный препарат имел белый цвет с бежевым оттенком.

2.1.2. Ультразвуковая обработка раствора фукоидана

Образцы водного раствора фукоидана концентрацией 10 мг/мл подвергали ультразвуковой обработке, используя ультразвуковой процессор UIP1000hd (Hielscher Ultrasonics GmbH, Германия) с максимальной интенсивностью 250 Вт/см² и частотой 20 кГц. Охлаждение осуществлялось с помощью ледяной бани. Для исследования изменения морфологии ультраструктурированного фукоидана осуществляли варьирование амплитуды с величиной 20, 40, 80 % от рабочего цикла, что соответствует интенсивности 100, 133, 200 Вт/см² соответственно с периодами 1, 5, 10, 20, 40 мин (t) в условиях отсутствия и введения ПАВ. Температура отслеживалась с помощью термодатчика и не превышала 313 К. Энергия (E) рассчитывалась как произведение полезной мощности на время ультразвукового воздействия [240] (Таблица 2).

Таблица 2 – Изменение ультразвуковой энергии при варьировании полезной мощности и времени воздействия, Вт·ч

Время, мин	Интенсивность ультразвука, Вт/см ²		
	100	133	200
1	1,67	2,22	0,14
5	8,33	11,08	16,67
10	16,67	22,17	33,33
20	33,33	44,33	66,67
40	66,67	88,67	133,33

2.1.3. Способы функционализации фукоидана магнетитом

Способ 1. К 10 мг/мл раствора фукоидана заданного объема при комнатной температуре и перемешивании прикапывали 1 мл 2 % суспензии Fe₂O₃. Полученный объем доводили до 10 мл и перемешивали на шейкере в течение 2 ч. Объем раствора полисахарида рассчитывали исходя из изменения соотношения магнетит:фукоидан 1:2,5 (ФМ25); 1:5 (ФМ50); 1:100 (ФМ100); 1:150 (ФМ150). Раствор фукоидана готовили используя полисахарид, подвергнутый высокоинтенсивному низкочастотному воздействию (20 кГц, 133 Вт/см²) в течение 40 мин, в 0,1 М фосфатно-солевом буфере (pH 7,4). 2 % суспензию Fe₂O₃ готовили в соответствии с методом химического соосаждения ионов Fe²⁺ и Fe³⁺ в присутствии NH₃·H₂O при комнатной температуре [241].

Способ 2. К 50 мл 10 мг/мл исходного полисахарида при перемешивании вносили 5 мл 2 % водной суспензии магнетита. Полученную систему подвергали ультразвуковому воздействию в течение 40 мин (20 кГц, 133 Вт/см²) с формированием образца Ф-УЗ.

Синтезированные композиты отделяли центрифугированием при 9 000 об/мин в течение 5 мин и промывали трижды 10 мл 0,1 М ФСБ. Затем готовили раствор с конечной концентрацией нанокompозита 10 мг/мл. Концентрацию несвязанного фукоидана оценивали в промывных водах спектрофотометрически с

применением метиленового синего. Количество магнетита в нанобиокомпозитах определяли гравиметрическим анализом. Выход нанобиокомпозита рассчитывали относительно массы исходных компонентов.

2.1.4. Иммобилизация тромболитического агента

0,05 г нанобиокомпозита (Ф25; Ф-УЗ) диспергировали в 5 мл 0,1 М ФСБ (рН 7,4), содержащего 1 мг/мл ТАП, и смешивали на шейкере (ПЭ-6500) при 150 об/мин в течение 1 ч, с образованием образцов ФМА и ФМУз, после чего при необходимости вносили додецилсульфат натрия (ДСН) до конечной концентрации 0,1 %, промывали 0,1 М ФСБ (рН 7,4) трижды.

Связывание носителя и фермента с помощью ковалентного взаимодействия осуществлялось посредством глутарового альдегида по оптимизированной методике J. Ни с соавторами [213]. 0,05 г нанобиокомпозита (Ф50) диспергировали в 5 мл 0,1 М ФСБ, содержащего 0,5 % глутарового альдегида, и перемешивали в течение 30 мин при 30 °С, затем промывали 0,1 М ФСБ (рН 7,4) трижды. После этого вносили 5 мл 0,1 М ФСБ (рН 7,4) содержащего 1 мг/мл ТАП, и перемешивали при 4 °С в течение 12 ч, с образованием образца ФМГа. При необходимости вносили ДСН до конечной концентрации 0,1 %, промывали 0,1 М ФСБ (рН 7,4) трижды.

Для всех образцов также варьировали концентрацию вносимого ТАП от 0,1 до 1 мг/мл с измерением гидродинамического диаметра.

2.2. Физико-химические методы исследования

2.2.1. Оценка параметров и распределения частиц

Диаметр частиц фукоидана после УЗ-обработки и сформированных нанобиокомпозитов оценивали методом динамического рассеивания света, методом сканирующей электронной микроскопии.

Измерение дзета-потенциала и гидродинамического диаметра осуществлялось с помощью Photocor Compact Z (ООО «Фотокор», Россия) при 23 °С с применением программного обеспечения Dynals. Измерение проводили при 23 °С под углом 20° и мощности излучения 10 мВ. При определении дзета-потенциала был применен углеродный электрод и напряжение 10 В/см. Исследование ультраструктуры, изучение формы, степени агрегации и оценка размера созданных частиц были осуществлены с помощью сканирующего электронного микроскопа Scanning system Tescan Vega 3 (Чехия) с напряжением 5 кэВ. Перед микроскопией образцы наносили на углеродный скотч, высушивали в вакуумном эксикаторе в течение 30 мин, после чего напыляли золото-платиновым покрытием с помощью настольной установки напыления SC7620 Mini Sputter Coater/Glow Discharge System.

Определение вязкости осуществлялось по методике Wei с соавторами [56] в 0,15 М водном растворе NaNO₃ при 25 °С с использованием капиллярного вискозиметра. Приведенную вязкость рассчитывали по уравнению Хаггинса (1):

$$\eta_{уд} / c = [\eta] + k'[\eta]^2 c. \quad (1)$$

Расчет молекулярной массы осуществлялся из предположения, что мономерным звеном является остаток фукозы.

2.2.2. Определение степени сульфатированности фукоидана

Определение степени сульфатированности осуществляли как описано в работе А. N. O'Neill [242].

К 0,2 мл образца полисахарида вносили 3,8 мл 3 % трихлоруксусной кислоты и 1 мл BaCl₂-желатиновый раствор, приготовленный по методике Н. Saito, Т. Yamagata, S. Suzuki [243] с последующим измерением абсорбции при 360 нм [244]. Количественное содержание сульфогрупп определяли по калибровочному графику относительно Na₂SO₄ [245]. При использовании ПАВ в качестве раствора

сравнения был взят образец ПЭГ или ДСН после сонолиза при тех же условиях, что и образец полисахарида.

2.2.3. Определение антиоксидантной активности фукоидана до и после ультразвуковой обработки

Хемилюминесценцию системы «образец полисахарида- H_2O_2 -люминол» определяли при 25 °С с помощью спектрофлуориметра Cary Eclipse (Agilent Technologies, США) с мощностью лампы накаливания 900 Вт. Измеряемым параметром выступала максимальная интенсивность хемилюминесценции. Для снятия спектра флуоресценции использовали реакционную среду общим объёмом 2 мл, включающую 1,5 мл рабочего раствора люминола, 0,25 мл образца фукоидана и 250 мкл 10 мМ H_2O_2 . Рабочий раствор люминола готовили растворением 0,02 г люминола в 50 мл 0,05 М NaOH. Для построения калибровочной кривой использовали растворы H_2O_2 с концентрацией $1 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Спектры хемилюминесценции снимали в интервале 390–600 нм. Интенсивность хемилюминесценции определяли, как соотношение I/I_0 , где I – интенсивность хемилюминесценции в присутствии образца полисахарида, I_0 – интенсивность хемилюминесценции холостой пробы.

2.2.4. Коагулологический анализ плазмы крови человека в присутствии фукоидана

Все клоттинговые тесты проводились с использованием коагулометра ЭМКО (АПГ4-03-Пх). По окончании коагуляции измеренное время свертывания выражали в секундах. В качестве контроля было взято 50 мкл плазмы крови человека, содержащей 10 мкл 0,9 % NaCl.

Определение протромбинового времени. 100 мкл тромбопластин-кальциевой смеси прогревали в течение 30 мин при 37 °С, затем вносили 50 мкл плазмы крови человека, содержащей 10 мкл раствора образца полисахарида.

Определение активированного частичного тромбопластинового времени. К 50 мкл АЧТВ-реагента, являющегося водным раствором эллаговой кислоты комнатной температуры вносили 50 мкл плазмы крови человека, содержащей 10 мкл раствора образца полисахарида, затем к полученной системе прибавляли 50 мкл 0,025 М раствора CaCl₂, прогретого при 37 °С в течение 30 мин.

Определение тромбинового времени. В 50 мкл плазмы крови человека, содержащей 10 мкл раствора образца полисахарида, вносили 50 мкл тромбина.

2.2.5. Определение содержания тромболитического агента

Степень (СВ) и эффективность вовлечения (ЭВ) ТАП в наноконпозиты определяли по отношению включенного фермента к количеству белка, используемого для подготовки (2), и к исходной массе частиц образцов (3) соответственно, где количество ТАП, содержащееся в нанобиоконпозите, устанавливали через измерение остаточного фермента в супернатанте и промывных водах после центрифугирования при 9 000 об/мин. Определение ТАП осуществляли спектрофотометрически окрашиванием по Бредфорду при 595 нм с использованием калибровочного графика по БСА. В качестве ТАП использовали коммерчески доступный препарат Actilyse® (Actilyse Cathflo, Boehringer Ingelheim, Германия). Спектрофотометрические измерения проводились с помощью спектрофотометра Cary 8454 UV-Vis Diode Array System (Agilent Technologies Bayan Lepas Free, Малайзия).

$$\text{СВ}(\%) = \frac{m(\text{исходного ТАП}) - m(\text{несвязанного ТАП})}{m(\text{исходного ТАП})} \cdot 100\% \quad (2)$$

$$\text{ЭВ}(\%) = \frac{m(\text{исходного ТАП}) - m(\text{несвязанного ТАП})}{m(\text{нанобиоконпозита})} \cdot 100\% \quad (3)$$

Исследование количества иммобилизованного фермента на полученные носители, его целостность и отсутствие агломерации осуществлялось также

электрофоретически в полиакриламидном геле. Кассеты заполняли сначала разделяющим, затем концентрирующим гелем с концентрацией 8 и 10 % соответственно (Таблица 3), которые затем помещали в камеру, заполненную 0,025 трис-0,192 М глициновым буфером (рН 8,3). Напряжение варьировали от 90 до 120 В. Электрофорез проводили в течение 40 мин.

Таблица 3 – Состав концентрирующего и разделяющего геля

Вид геля	Концентрация геля, %	Состав					
		40 % АА, мл	2М Трис- НСl рН 6,8/8,8, мл	20 % ДСН, мл	10 % ПСА, мкл	ТЕМЕД, мкл	H ₂ O
Концентрирующий	10	2,46	1,88	0,06	100	10	5,46
Разделяющий	8	2	1,88	0,06	100	10	5,96

Пробы готовили в соответствии с работой E. Maltas, M. Ozmen, H. C. Vural и др. [246]. 1 мл образца нанобиокомпозита, содержащего 58 ед/мг ТАП, кипятили в течение 3–5 мин с 3·SDS-Sample буфером. 3·SDS-Sample буфер состоял из 1,5 мл 1 М Трис-НСl (рН 6,8), 0,6 г ДСН, 3,45 г глицерина (87 %), 0,3 мл β-меркаптоэтанола и 4 мл 10 % бромовенолового синего. В качестве контроля выступал раствор ТАП с концентрацией 0,1 мг/мл. Полученные гели окрашивали Кумасси G-250. Изображение фиксировали с помощью системы гель-документирования ChemiDoc Imaging System.

2.2.6. Определение магнитных свойств нанобиокомпозитов

Магнитные свойства полученных нанобиокомпозитов измеряли с помощью вибрационного магнитометра Lake Shore Cryotronics VSM 7410-S (LakeShore Cryotronic, США).

100 мкл водной дисперсии МНЧ и нанобиокомпозитов ФМА, ФМГа, ФМУз помещали в поликарбонатную капсулу и измеряли намагниченность в приложенных полях в диапазоне от 0 до 6000 кА/м при комнатной температуре.

2.2.7. Определение каталитических свойств иммобилизованного ТАП

Определение амидолитической активности. Амидолитическую активность ТАП определяли спектрофотометрически с применением хромогенного субстрата в стандартизированной плазме крови человека [234]. Свежеприготовленные золи образцов нанобиокомпозитов (0,5 мл) с конечной концентрацией ТАП 58 ед/мг смешивали с 0,5 мл плазмы крови человека и инкубировали в течение 10 мин при 37 °С. После этого вносили 0,5 мл хромогенного субстрата и выдерживали 120 с. Затем добавляли 0,5 мл 30 % уксусной кислоты и вновь инкубировали в течение 5–10 мин. Измерение поглощения проводили в кювете с величиной оптического пути 1 см с помощью спектрофотометра Cary 8454 UV-Vis Diode Array System (Agilent Technologies Bayan Lepas Free, Малайзия) относительно физиологического раствора 0,15 М NaCl. Используемая длина волны – 405 нм. В качестве рабочего раствора выступал 0,5 мл 0,05 М Трис-НСl буфером (рН 7,4) с внесенным 0,5 мл раствором 0,1 мг/мл ТАП, который предварительно разводили в соотношении 1:0,5; 1:2; 1:2,5; 1:4; 1:5. В качестве контроля выступали образцы золь нанобиокомпозитов, не содержащие ТАП.

Кинетику реакции регистрировали путем измерения поглощения раствора без остановки реакции. Для этого свежеприготовленные золи образцов нанобиокомпозитов (0,5 мл) с конечной концентрацией ТАП 0,1 мг/мл и контрольный раствор смешивали с 0,5 мл плазмы крови человека, инкубировали в течение 10 мин при 37 °С, после чего вносили 0,5 мл хромогенного субстрата и измеряли поглощение в течение 1 ч с диапазоном в 30 с. Из полученных значений величин оптической плотности образцов нанобиокомпозитов вычитали величину оптической плотности контрольного образца.

Определение фибринолитической активности. Модельные системы фибриновых сгустков готовили с применением раствора тромбина 50 ед/мл в физиологическом (0,9 %) растворе NaCl и стандартной плазмы, в качестве которой была использована плазма крови человека с концентрацией плазминогена 102 мг/мл, фибриногена 2,8 мг/мл. Для приготовления модельных фибриновых сгустков на предметном стекле смешивали 0,5 мл стандартной плазмы и 0,5 мл раствора тромбина при 37 °С, оставляли на 5 мин для формирования сгустка. После этого плазменный сгусток промывали 0,1 М ФСБ (рН 7,4), помещали на чистое предметное стекло и вносили 100 мкл золя полученных нанокомпозитов с конечной концентрацией ТАП 58 ед/мг (в качестве контроля был использован 0,1 мг/мл раствор ТАП в 0,1 М ФСБ (рН 7,4)). Морфологические изменения сгустка наблюдали с помощью оптической микроскопии с отслеживанием и фотофиксированием состояния через каждые 10 мин.

Исследование фибринолитической активности иммобилизованного ТАП в плазме крови осуществляли фиксированием плазменных сгустков в агарозном геле. Фибринсодержащие агарозные гели готовили путем смешивания 1 % раствора легкоплавкой агарозы в 0,1 М Трис-НСl буфере (рН 7,4) и 5 ед/мг раствора тромбина, полученного разбавлением 50 ед/мг тем же буфером (0,1 М Трис-НСl). Полученную систему перемешивали и инкубировали в течение 10 мин при 37 °С. Затем вносили стандартную плазму человека с концентрацией фибриногена 2,8 мг/мл, быстро перемешивали (в течение 30 с) и разливали по криовиальным пробиркам в равных объемах. После этого пробирки вновь инкубировали в течение 2 ч при 37 °С. В полученные фибрин-агарозные гели вносили 30 мкл образцов золь композитов с концентрацией ТАП 58 ед/мг, 30 мкл 0,1 мг/мл ТАП в качестве положительного контроля, 30 мкл 0,1 М Трис-НСl буфера в качестве отрицательного контроля. Системы, содержащие образцы золь нанокомпозитов, делали в двух параллельных измерениях в условиях наличия магнитного поля и его отсутствия. Пробирки укупоривали и оставляли на 8 ч при 37 °С. В результате оценивали высоту агарозного геля, не содержащего фибриновые сгустки. Измерения проводились трижды.

2.2.8. Оценка высвобождения тромболитического агента

ТАП-содержащие нанокомпозиты ФМА, ФМГа, ФМУ₃ диспергировали в 1 мл 0,1 М ФСБ (рН 7,4) до конечной концентрации ТАП 1 мг/мл, перемешивали при 37 °С на шейкере (ПЭ-6500) при 400 об/мин. Пробы объёмом 0,1 мл отбирались через заданные промежутки времени после магнитного осаждения с последующим ресуспендированием и добавлением свежего буфера. Супернатант анализировали на содержание белка окрашиванием по методу Бредфорда при 595 нм по калибровочному графику по БСА.

2.2.9. Определение цитотоксичности с помощью МТТ-анализа

Для оценки цитотоксичности полученных нанобиокомпозитов в качестве клеток-мишеней были выбраны клетки опухолевых линий рака шейки матки человека HeLa (Biolog, Санкт-Петербург, Россия). Их культивировали в среде DMEM с низким содержанием глюкозы (1 г/л) с добавлением 10 % инактивированной фетальной бычьей сыворотки (Gibco), 50 мкг/мл гентамицина (Biolog) в CO₂-инкубаторе при 37 °С, 5 % CO₂.

Клетки в логарифмической фазе роста высевали в 96-луночные планшеты. Вносили образцы нанобиокомпозитов, ресуспендированных в культуральной среде, с конечной концентрацией 1,531; 3,063; 6,125; 12,25; 24,5 мкг/мл, где объем добавленных зелей не превышал 10 % культуральной среды в лунках, и инкубировали в течение 72 ч.

После 3 суток среду с частицами удаляли и в каждую лунку вносили 180 мкл свежей ростовой среды и 20 мкл раствора 5 мг/мл МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) в ФСБ (рН 7,4). После инкубации в течение 2 ч при 37 °С в CO₂ ростовую среду удаляли и вносили 200 мкл ДМСО для растворения гранул формазана. Измерение оптической плотности осуществляли при длине волны 570 нм с помощью микропланшетного фотометра Infinite 50 (Tecan, Австрия). По изменению оптической плотности оценивали цитотоксичность

композитов, где жизнеспособность клеток определяли, как процент отношения оптической плотности в лунках к оптической плотности необработанных клеток. Все измерения проводили трижды.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Подбор оптимальных условий контролируемой ультразвуковой деградации фукоидана

Использование фукоидана в системах доставки сводится к созданию покрытий или функционализации поверхности темплатов различной природы, а также формированию таргетных систем в комбинации с другими полимерами как природного, так и синтетического происхождения. В литературе имеются данные о применении фукоидана в качестве «вектора» тромболитического агента, однако в этом случае требуется многостадийная химическая модификация фукоидана с введением в структуру полисахарида аминогрупп [86]. Создание объектов на основе фукоидана наноразмерного уровня с формой, приближенной к сферической, применимого в качестве носителя ЛВ, явилось нашей первой задачей, для решения которой предполагалось использовать подход «сверху-вниз». Была предложена деполимеризация фукоидана меньшей молекулярной массы из высокомолекулярного полисахарида, где способом получения оптимального размера частиц является применение ультразвуковой энергии. Известно, что сонолиз используется для получения низкомолекулярных полимеров, в частности природного происхождения. Так, ультразвуковая деградация изучена для таких водорастворимых полимеров, как хитозан [247], пектин [248,249], декстран [142,250], агароза [251], целлюлоза [252], фукоидан, выделенный из морского огурца [145], однако большая часть этих работ направлена на изучение реологических свойств полученных систем [253] и молекулярно-массовое распределение [138].

В ходе работы предполагалось исследование влияния высокоинтенсивного низкочастотного ультразвукового воздействия на ультраструктуру и биологическую активность фукоидана, выделенного из бурых водорослей. Для оценки эффекта сонолиза во времени высокомолекулярный фукоидан был диспергирован в концентрации 10 мг/мл в деионизированной воде и подвергнут

ультразвуковому воздействию в течение 1, 5, 10, 20 и 40 мин при варьировании ультразвуковой мощности.

На следующем этапе работы ультразвуковая деградация осуществлялась при внесении ионогенных (ДСН) и неионогенных (ПЭГ) поверхностно-активных веществ. При этом для каждого образца производилось исследование размера, дзета-потенциала, степени сульфатированности, антиоксидантной и антикоагулянтной активности продуктов сонолиза.

3.1.1. Анализ ультраструктуры и гидродинамические параметры образцов фукоидана

Модификация ультраструктуры полисахарида после ультразвукового воздействия может лежать в основе изменения его физико-химических свойств. Поэтому для определения механизма данных изменений важно изучить трансформацию ультраструктуры полисахарида при ультразвуковой обработке в условиях варьирования мощности воздействия. СЭМ-изображения и ДРС позволяют получить информацию о форме частиц, их размере и распределении.

В ходе работы был использован фукоидан, выделенный из *Fucus vesiculosus*, по методике, описанной в работе А. М. Урванцева, И. Ю. Бакунина, Н. Ю. Ким и др. [102]. Сонохимическая обработка осуществлялась при частоте 20 кГц с варьированием амплитуды с величиной 20, 40, 80 % от рабочего цикла, что соответствовало интенсивности 100, 133, 200 Вт/см² (рисунок 10 А, Б). Масса фукоидана после ультразвуковой обработки без осуществления фильтрации составила 47,5±0,84, 32,6±1,32, 11,4±0,68 % соответственно.

Определено бимодальное распределение частиц, включающее недеполимеризованный фукоидан, а также частицы, подверженные ультразвуковой деструкции. Поэтому для анализа более низкомолекулярной фракции методом ДРС осуществлялась фильтрация пробы через фильтр с диаметром пор 500 нм.

Анализ СЭМ-изображений может дать более полную картину изменений полисахарида после ультразвукового воздействия. Исходный высокомолекулярный фукоидан имеет организованную структуру с полигональной формой частиц (Рисунок 10 В).



Рисунок 10 – Схема получения образцов (А) и изображение применяемой ультразвуковой установки (Б);

СЭМ-изображение раствора исходного фукоидана (В)

Схожее строение выявлено для низкомолекулярного фукоидана, помимо него он может иметь форму сферолитов и одиночных линейных цепей [53,55]. Структуры исходного биополимера и подверженного ультразвуковому воздействию различны по размеру, однако полигональная форма частиц, близкая к сферолитам, сохраняется при варьировании мощности воздействия (Рисунок 11 А).

По предположению R. L. Andrade с соавторами именно кристаллическая форма является одной из причин существенных различий в биологической активности фукоиданов и сульфатированных фуканов, имеющих схожую химическую структуру цепей [2].

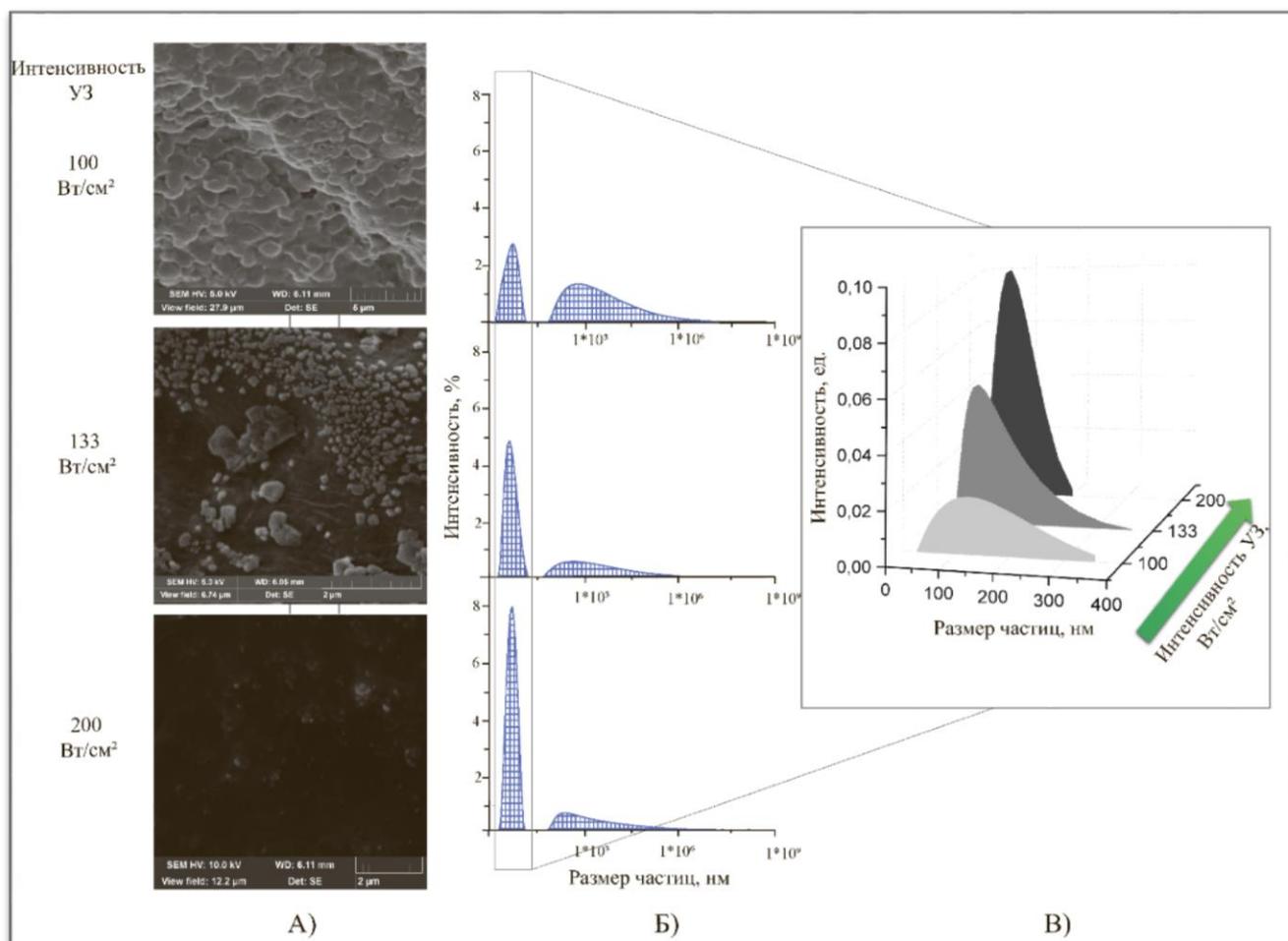


Рисунок 11 – Распределение частиц фукоидана после УЗ-обработки:
 А) – СЭМ-изображения фукоидана после УЗ-обработки в течение 40 мин (20 кГц)
 при варьировании мощности воздействия;
 Б), В) – гидродинамический диаметр частиц деполимеризованного фукоидана
 после УЗ-обработки в течение 40 мин (20 кГц)
 при варьировании мощности воздействия

По данным СЭМ, первоначальный размер частиц полисахарида достигал $8,21 \pm 3,17 \mu\text{m}$ ($10,4 \pm 2,7 \mu\text{m}$ – по данным ДРС), однако по мере роста интенсивности

ультразвукового воздействия наблюдается увеличение доли частиц значительно меньшего диаметра (Рисунок 11 Б, В). При амплитуде в 20 % размер частиц варьируется от $395,7 \pm 69,4$ до $1702,3 \pm 166,6$ нм, при 40 % – от $73,6 \pm 14,5$ до 423 ± 58 нм (крупные конгломераты частиц в расчете не были учтены), при 80 % – от $38,4 \pm 5,4$ до $119,6 \pm 17$ нм. Интересно, что после обработки ультразвуком интенсивностью 100 и 133 Вт/см² наблюдаются конгломератные структуры, которые могут быть связаны со сшиванием деградированного полисахарида под действием высокоинтенсивного низкочастотного ультразвука [249]. Процессом сшивания также объясняется нелинейный характер изменения размера частиц в процессе УЗ-обработки (Рисунок 12 в).

В результате сонолиза наблюдается значительное уменьшение размера молекул фукоидана начиная с первой минуты воздействия по сравнению с нативным полисахаридом, подтвержденное методом лазерной корреляционной спектроскопии. Первичное разрушение частиц полисахарида облегчает доступ растворителя к частям макромолекул и приводит к увеличению площади ультразвукового воздействия. Средний гидродинамический диаметр молекул фукоидана был рассчитан с помощью уравнения Эйнштейна – Стокса. При 80 % рабочем цикле ультразвука он составил $85,9 \pm 33$ нм, в то время как при 20 % рабочем цикле $113,5 \pm 69,9$ нм (Рисунок 12 в), т. е. при четырехкратном увеличении рабочего цикла размер молекул уменьшился в 1,3 раза, что может быть связано с достаточным временем для образования кавитаций. При 40 % рабочем цикле средний размер частиц составил $101,5 \pm 41,3$ нм. Причем дальнейшее повышение времени ультразвукового воздействия (до 80 мин) не привело к существенному изменению размера. Измерения, полученные с помощью ДРС, показали логарифмически нормальное распределение частиц с ростом доли более низкомолекулярных компонентов в условиях повышения мощности ультразвукового воздействия для всех образцов (см. Рисунок 10 Б, В). Таким образом, увеличение мощности ультразвукового воздействия имело положительную корреляцию с размером частиц низкомолекулярного фукоидана, т. е. с увеличением мощности наблюдается уменьшение размера частиц.

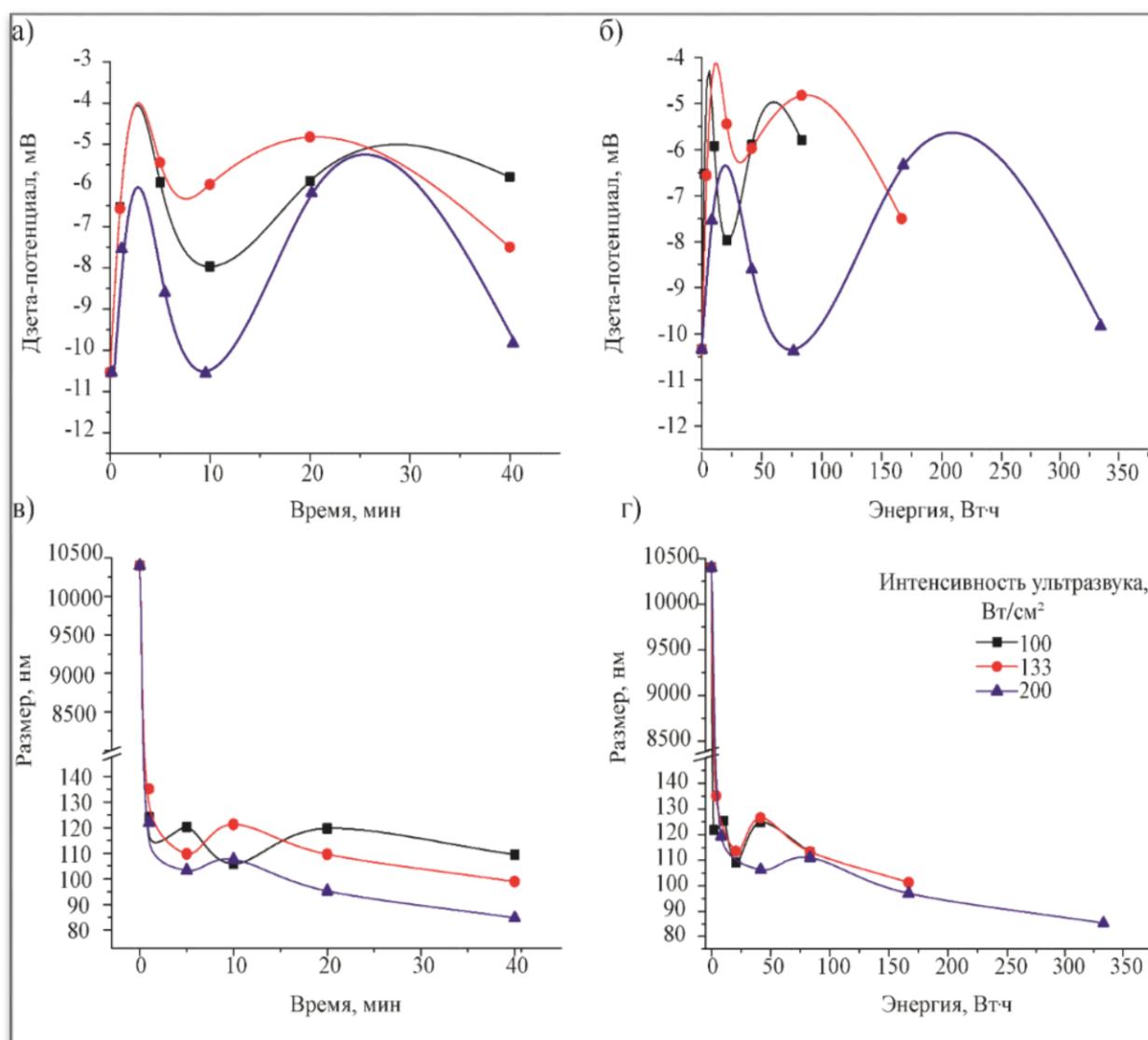


Рисунок 12 – Кривые изменения гидродинамического диаметра и дзета-потенциала при варьировании интенсивности ультразвукового воздействия

Кривые изменения дзета-потенциала показали аналогичные зависимости для всех интенсивностей воздействия, однако при интенсивности 100, 133 Вт/см² обладали более сглаженным видом (Рисунок 12 а, б). Нелинейный характер изменения дзета-потенциала может быть связан с в том числе двумя поочередными процессами: а) частичной потерей функциональных групп (например, десульфатацией полисахарида при ультразвуковом воздействии, ox-red процесса и т. д.); б) увеличением количества доступных сульфогрупп вследствие деполимеризации фукоидана.

Кривые изменения размера при интенсивности 133 и 200 Вт/см² имели схожий вид (Рисунок 12 в, г), а именно положение пиков и форму кривой. Причем это изменение в течение времени имеет нелинейный осцилляционный характер для всех образцов. Повышение размера частиц на 5 и 20 мин для 20 % рабочего цикла и на 10 мин для 40 и 80 % рабочего цикла может свидетельствовать о несистематичности деполимеризации цепи полисахарида, характерной для радикальной атаки. Однако в работе S. Koda с соавторами отмечается, что такое явление наблюдается лишь при ультразвуковой обработке полимеров с частотой выше 500 кГц, имеющей большую эффективность [254]. В то же время в работе G. Portenlänger и H. Neusinger [142] и P. Pirkonen с соавторами [255] более высокая эффективность сонолиза отмечается и при низкочастотном воздействии в 35 и 23 кГц соответственно. Эти различия связаны с варьированием рабочей мощности ультразвука (в работе S. Koda она имеет постоянное значение в 20 Вт, а в работе G. Portenlänger и H. Neusinger возрастала до 500 Вт), в данном исследовании мощность ультразвука также не была постоянной, а максимально могла повыситься до 500 Вт. Поэтому допустимо преобладание радикальных механизмов деполяризации фукоидана в водном растворе, возможно, связанных в том числе с образованием молекул H₂O₂.

С другой стороны, изменение размера может зависеть от интенсивности кавитации. В ходе сонолиза в жидкости формируются полости – кавитационные пузыри, содержащие растворенные газы, вещества с высокой упругостью пара и пары воды, которые в таких полостях под действием тепловой или электрической активации подвергаются кавитационному расщеплению.

Под действием звукового поля кавитационные пузыри испытывают циклы высокого и низкого давления, что приводит к их осцилляции. При низкочастотном воздействии в отличие от высокочастотного (более 350 кГц) наблюдается инерционная кавитация, где кавитационные пузырьки проходят меньшее количество осцилляций, однако увеличиваются до большего размера, в результате их коллапса наблюдается усиление механического эффекта и увеличение производства свободных радикалов [256].

Деградация при сонохимической обработке обусловлена механическим, термическим и радикальным воздействием акустической кавитации. Причем для полимеров именно механический эффект выходит на первый план и увеличивается с ростом полимерной цепи [142]. Коллапс кавитационных пузырьков создает ударную волну, достаточную для разрушения слабых химических связей и повышения до высоких скоростей частиц жидких систем, которые в результате столкновений могут изменять морфологию и реакционную способность [139]. Поэтому нелинейный характер изменения размера частиц может быть обусловлен осцилляцией кавитационных пузырьков, ударная волна которых при схлопывании приводит к изменениям микроструктуры и морфологии частиц, т. е. кавитация может способствовать как уменьшению размера частиц, так и их росту [257]. Однако такой подход оставляет открытым вопрос о несоответствии времени осцилляции кавитационных пузырьков и частоты колебания размера частиц [257].

Характеристическая вязкость отражает гидродинамический объём, занимаемый макромолекулами полимера в растворе [258]. Однако в дистиллированной воде макромолекулы кислотного полисахарида полиэлектролитно набухают, в результате электростатического эффекта отталкиваются друг от друга, и, как следствие, при разведении пониженная вязкость непрерывно растет [56]. Для устранения этой проблемы измерение вязкости осуществляется в присутствии низкомолекулярных электролитов – солей [259].

Для всех образцов наблюдается нормальная линейная зависимость. Константа Хаггинса (k') рассчитывали по формуле (1). Средневесовая молекулярная масса обработанного фукоидана, рассматривается в первом приближении (Таблица 4).

Таблица 4 – Экспериментальные показатели средневесовой молекулярной массы деполимеризованного фукоидана

Мощность УЗ, Вт/см ²	η (уд), мл/г	k'	$M_w \times 10^{-4}$, г/моль	Степень полимеризации
100	1,72	0,43	3,31	202,05
133	1,43	0,72	2,6	158,72
200	1,11	0,42	1,88	114,42

Низкие показатели значения константы Хаггинса (<2) могут говорить об игольчатой форме полученных структур. Также подтверждается снижение молекулярной массы с ростом интенсивности ультразвукового воздействия.

***Гидродинамические параметры фукоидана после УЗ-обработки
в условиях введения ПАВ***

ПАВ позволяют увеличить растворимость полисахаридов в воде [260], поэтому их введение позволит увеличить степень смачиваемости частиц и эффективность ультразвука. Кроме того, ПАВ могут привести к стабилизации, образующейся в ходе сонолиза H_2O_2 , что позволит снизить влияние радикального эффекта ультразвукового воздействия.

В работе использовалось неионогенное и ионогенное ПАВ (ПЭГ-400 и ДСН) при постоянной интенсивности ультразвукового воздействия в 133 Вт/см².

Введение ПАВ при сохранении условий ультразвуковой обработки привело к постепенному снижению гидродинамического диаметра с увеличением времени ультразвуковой обработки по экспоненциальной зависимости, характерного для механического эффекта сонолиза (Рисунок 13).

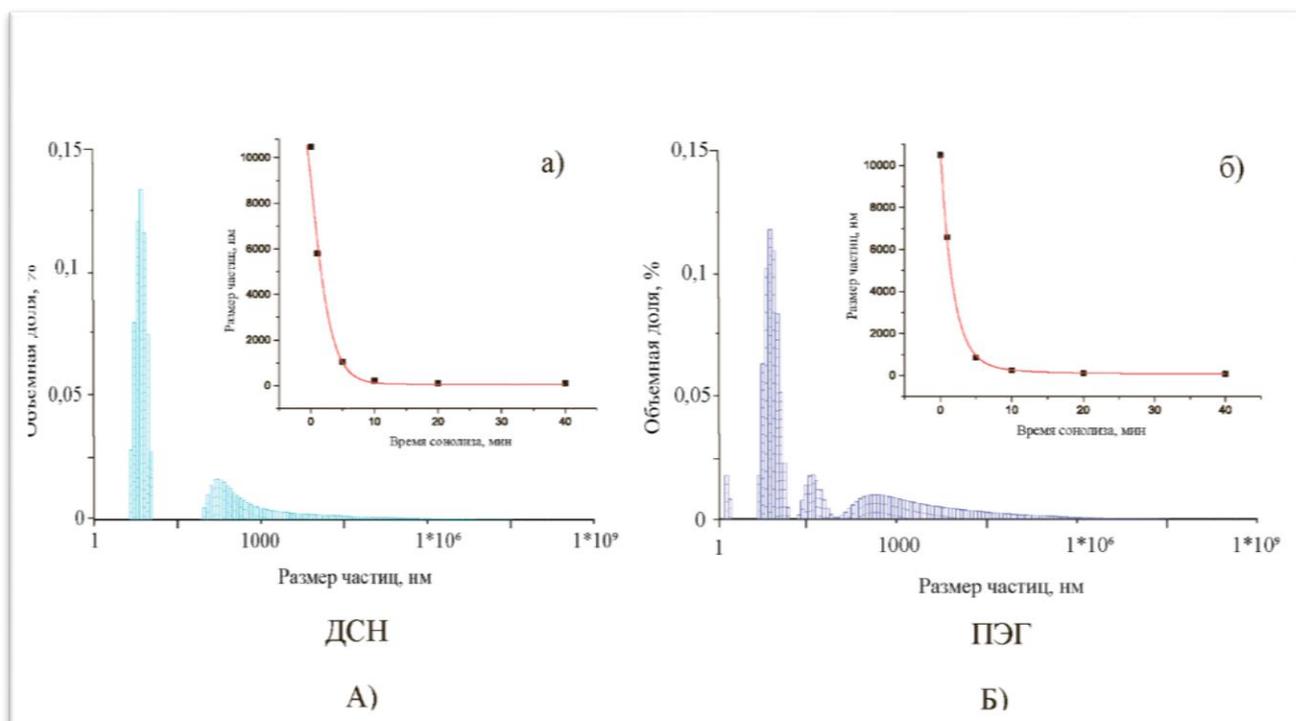


Рисунок 13 – Зависимость размера частиц фукоидана от времени воздействия (а, б) и их распределение в условиях сонолиза в течение 40 мин (133 Вт/см^2 с амплитудой 40 %) в присутствии ионогенного (А) и неионогенного (Б) ПАВ

После первой минуты обработки размер частиц в условиях введения ПАВ сократился значительно меньше (до $6,5 \pm 0,4 \text{ мкм}$ для ПЭГ и до $5,8 \pm 0,3 \text{ мкм}$ для ДСН) (Рисунок 13 а, б), чем при тех же условиях, но без внесения ПАВ (до $135,1 \pm 45 \text{ нм}$), падение значения дзета-потенциала также может быть обусловлено частичной десульфатацией полисахарида после первой минуты ультразвукового воздействия (Рисунок 14).

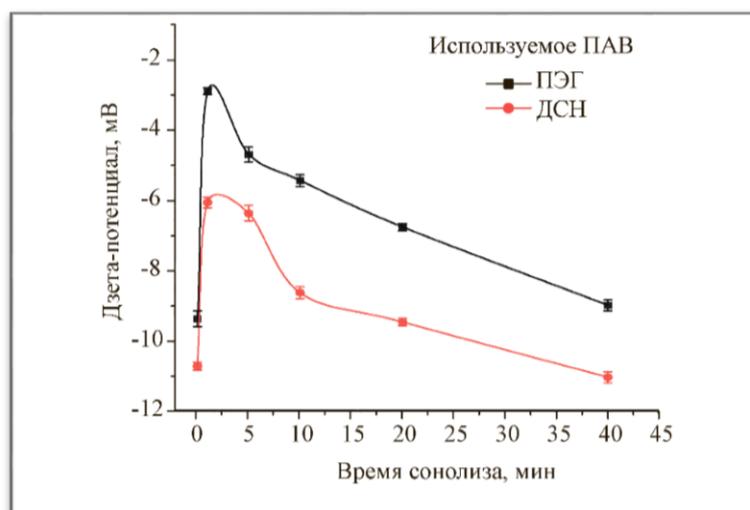


Рисунок 14 – Изменение электрохимического потенциала частиц фукоидана в результате сонолиза в присутствии ПАВ

При этом с увеличением времени воздействия эффективность ультразвука снижается, что может быть связано с образованием фрагментов с низкой молекулярной массой, являющихся более жесткими и требующих больших затрат энергии на их дальнейшую деполимеризацию. Эффективность воздействия максимальна в течение первых 10 мин, в то время как последующая обработка не привела к значительным изменениям гидродинамического диаметра молекул биополимера. Размер частиц после 40 мин обработки в присутствии ПАВ составил $123,6 \pm 36,5$ и $83,1 \pm 25,4$ нм.

Это может свидетельствовать о малой роли радикальных механизмов с преобладанием механических факторов сонолиза. Данное положение согласуется с результатами работы А. Henglein, где показано что присутствие ПАВ в водном растворе приводит к уменьшению первичных радикалов за счет их связывания молекулами ПАВ [261,262].

Введение ПАВ препятствует силе Бьеркнеса, приводя к электростатической репульсии кавитационных пузырьков [263] при применении ионогенных ПАВ за счет адсорбции молекул ПАВ на их поверхности либо за счет увеличения поверхностного натяжения кавитационный пузырь – жидкость, а при применении неионогенных ПАВ предотвращается их коалесценция, в результате

осуществляется более равномерное распределение пузырьков по размеру и усиливается акустическая энергия, а следовательно, и эффективность ультразвука. Отсутствие коалесценции замедляет рост кавитационных пузырьков, увеличивается срок их жизни, и большинство радикалов, образуемых в пределах активного пузырька и конденсированных на внутренней поверхности [264], рекомбинируют либо лишь частично диффундируют. Это приводит к меньшему количеству химических превращений за счет снижения активных радикалов по сравнению с условиями более быстрого роста и коллапса кавитационных пузырей, а также уменьшения силы ударной волны и вероятности роста частиц жидкой среды. Все сказанное приводит к предположению о преобладании механического эффекта кавитации при сонолизе фукоидана в условиях введения ПАВ.

Таким образом, к ингибированию деградации фукоидана, а также снижению эффективности ультразвукового воздействия в условиях введения анионогенных (ДСН) и неионогенных (ПЭГ) ПАВ на первых минутах сонолиза, приводит, во-первых, конкурентная адсорбция ионогенных ПАВ на поверхности раздела кавитационный пузырь – жидкость, во-вторых, энергия, генерируемая ультразвуковой установкой, расходуется не только на деструкцию полисахарида, но и на деструкцию молекул ПАВ [265].

С другой стороны, возможна стабилизация образуемой в процессе сонолиза перекиси водорода с помощью ПАВ через смещение равновесия ассоциированная/диссоциированная форма H_2O_2 в сторону последней, что ведет к взаимодействию пероксида водорода с макромолекулами с образованием комплексов «ПАВ – H_2O_2 » [266] и способствует превалированию механического эффекта при сонолизе полисахарида.

Таким образом, из рассмотренного следует, что деполимеризация фукоидана в результате сонолиза в водной среде возможна в результате преобладания радикального эффекта ультразвукового воздействия, присутствие же ПАВ приводит к преобладанию механического эффекта.

3.1.2. Изменение степени сульфатированности фукоидана при сонохимической обработке

Задачей следующего этапа работы было определение влияния изменения параметров акустических условий на степень сульфатированности фукоидана. Степень сульфатированности является важной характеристикой в том числе биологической активности, например одним из основных факторов антикоагулянтного, антипролиферативного действия фукоидана [111].

Содержание сульфогрупп в макромолекуле фукоидана зависит от ряда факторов, в том числе от вида водоросли, из которой происходит добыча полисахарида. Так, например, для *Sargassum muticum* максимальное содержание составляет $39,54 \pm 0,001$ мг сульфат-иона/г извлечения [111], *Fucus vesiculosus* – $44,1 \pm 0,16$ г сульфат-иона/100 г сухого сырья [267], *Padina gymnospora* – $27,57 \pm 0,18$ г сульфат-иона/100 г сухого сырья [267].

Для всех интенсивностей сонохимической обработки наблюдается периодический характер зависимости степени сульфатированности от времени воздействия, схожий с изменением размера во времени. Так, при варьировании интенсивности ультразвукового воздействия и вида ПАВ во всех случаях после первой минуты обработки наблюдается снижение степени сульфатированности (Рисунок 15), о чем свидетельствует также и повышение электрокинетического потенциала. Такое снижение степени сульфатированности может быть обусловлено протекаемыми окислительно-восстановительными процессами в результате влияния УЗ. С 1-й по 5-ю мин обработки (а также на 20-ю мин при обработке без применения ПАВ) могут быть выражены в большей степени процессы восстановления сульфогрупп, причем молекулы ПАВ способствуют их протеканию, а с 10-й по 40-ю – окисления продуктов, выраженные в разной степени. Поэтому при длительном ультразвуковом воздействии наблюдается увеличение количества сульфогрупп (по сравнению с 1-й мин обработки), что согласуется с результатами, полученными в работе X. Guo, X. Ye, Y. Sun с соавторами [145]. Степень сульфатированности после 40 мин обработки при 40 и

80 % рабочей мощности без присутствия ПАВ упала на 3,63 и 3,12 % соответственно по сравнению с исходным полисахаридом. Исключение составляет обработка полисахарида при 100 Вт/см² (Рисунок 15 а), где наименьшая степень сульфатированности наблюдается после 40 мин УЗ-обработки (степень сульфатированности снизилась на 12,09 %), что может быть связано с недостаточной приложенной энергией для red-ox процесса. При введении ПАВ степень сульфатированности снизилась на 9,61 % в присутствии ДСН и на 12,32 % в присутствии ПЭГ.

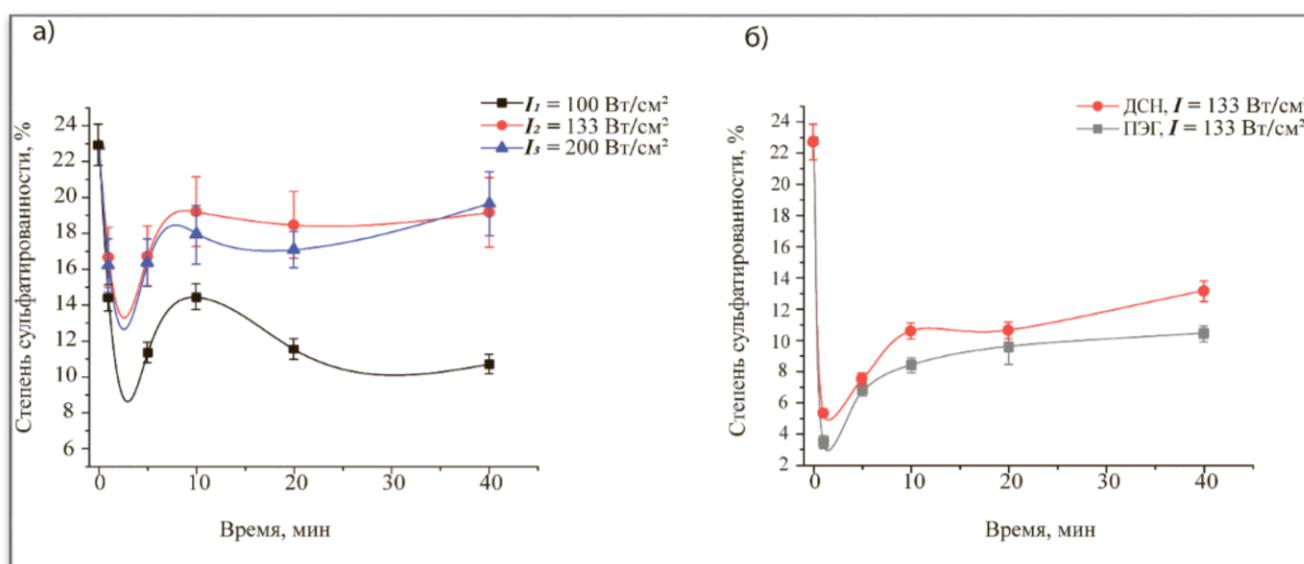


Рисунок 15 – Изменение степени сульфатированности:

- (а) – при варьировании интенсивности (I) ультразвукового воздействия;
- (б) – в условиях введения поверхностно-активных веществ (ДСН, ПЭГ) без изменения интенсивности сонохимической обработки

На начальных этапах ультразвукового воздействия осуществляется деградация молекул большей молекулярной массы, причем предполагается, что разрыв полимерных цепей в результате сонолиза не носит случайный характер, а осуществляется в середине молекулы [142], и разрушение начинается со слабых связей, таких как Ван-дер-Ваальсовы. Известно, что наиболее чувствительны к сдвиговой силе ударной волны гликозидные связи (1) и водородные (2) [268],

в нашей работе показана также некоторая чувствительность и сульфогрупп (3) (Рисунок 16).

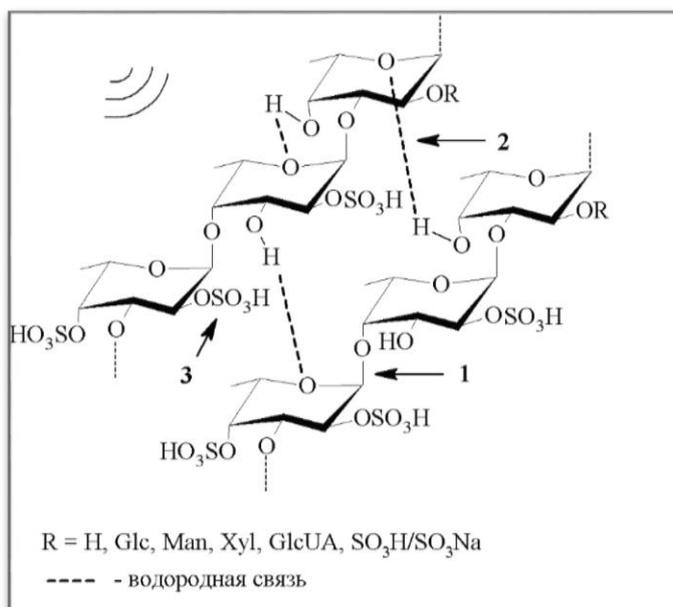


Рисунок 16 – Вероятный механизм сонолиза фукоидана в водной среде:
(1) – гликозидные связи; (2) – водородные связи; (3) – сульфогруппы

3.1.3. Влияние высокоинтенсивного низкочастотного ультразвукового воздействия на биологическую активность фукоидана

Изменение антиоксидантной активности фукоидана

Варьирование степени сульфатированности, молекулярной массы влияет на антиоксидантную активность сульфатированных полисахаридов, которые являются наиболее важными параметрами для данной активности [116,269]. Связь между размером макромолекул фукоидана и антиоксидантной активностью может не иметь линейного характера вследствие пространственной структуры полисахарида, влияющей на положение активных групп [270,271].

При рассмотрении антиоксидантной активности необходимо отметить, что фукоидан оказывает ингибирующее действие на образование гидроксильных радикалов и супероксидных радикалов [38,267], его можно отнести к классу

первичных антиоксидантов за счет высокой молекулярной массы и наличия подвижного атома водорода, что позволяет выступать в качестве внешнего «Н-donors» на стадии отрыва водорода перекисным радикалом. Присутствие электроноакцепторной сульфатной группы изменяет полярность соединения и приводит к активированию водорода аномерного атома углерода, что позволяет усилить антиоксидантную активность [59,272].

Одним из способов определения антиоксидантной емкости является хемилюминесцентный метод с измерением степени тушения хемилюминесценции (TAR-метод), где в качестве активатора хемилюминесценции выступает люминол [273].

С повышением времени ультразвуковой обработки интенсивность свечения падала для всех образцов фукоидана. Однако максимальное падение наблюдалось только для образца, полученного после 40 мин ультразвукового воздействия с интенсивностью 100 Вт/см^2 , что указывает на бóльшую его антиоксидантную активность. Кроме того, наблюдается уменьшение антиоксидантной активности с повышением интенсивности ультразвука (Рисунок 17), а также относительно нативного фукоидана (интенсивность хемилюминесценции для природного фукоидана составила $I/I_0 = 0,79 \pm 0,026$).

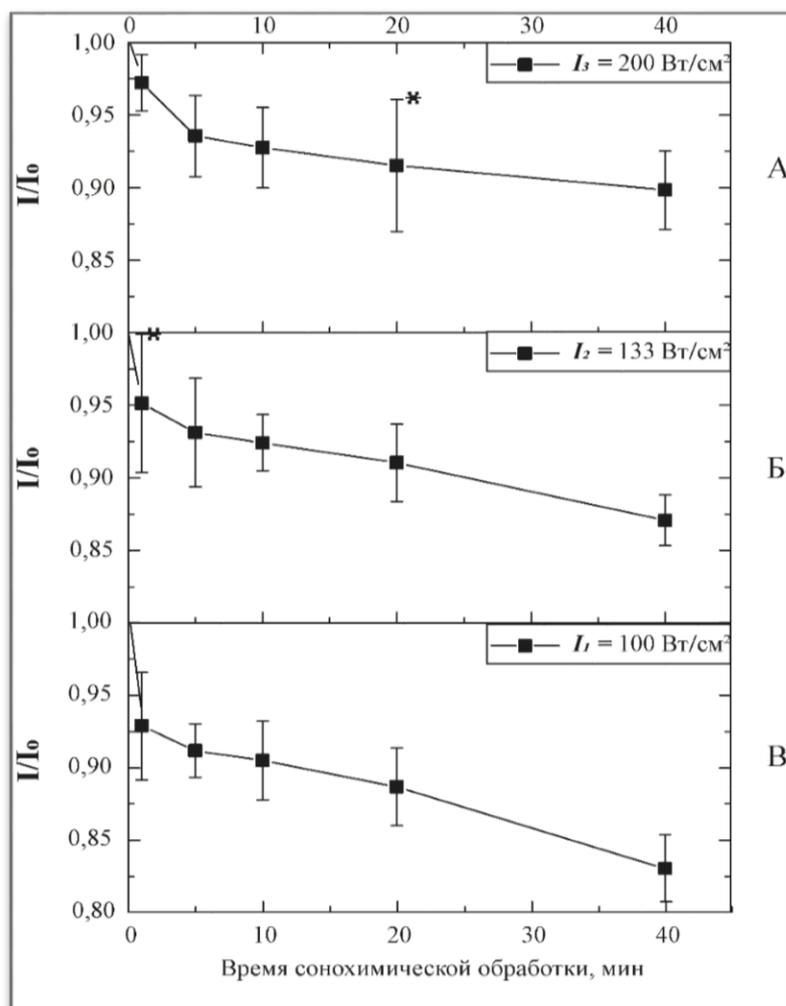


Рисунок 17 – Влияние времени сонохимической обработки фукоидана на интенсивность хемилюминесценции системы «полисахарид- H_2O_2 -люминол» (* по результату 5 измерений)

Такое снижение может быть обусловлено процессами, связанными со снижением степени сульфатированности полисахарида. Повышение же антиоксидантной активности может быть связано с увеличением количества восстанавливающих сахаров на единицу объёма при той же концентрации вследствие снижения молекулярной массы фукоидана, а также указывает на возможность присутствия механического эффекта сонолиза фукоидана в деионизированной воде. Данные результаты подтверждают положение о большей антиоксидантной активности низкомолекулярных фукоиданов [125].

***Влияние УЗ-обработанного фукоидана на коагуляционную активность
плазмы крови человека***

Для определения антикоагулянтной активности обработанного фукоидана были использованы следующие клоттинговые тесты: определение протромбинового времени (ПВ), активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) и тромбинового времени (ТВ). Тест ПВ позволил оценить влияние образцов фукоидана на внешний путь свертывания крови, тест АЧТВ – на внутренний, а тест ТВ выявил воздействие фукоиданов на скорость образования фибрина из фибриногена. В ходе работы был использован раствор 0,1 мг/мл исходного фукоидана (1А), и обработанного при варьировании интенсивности УЗ-обработки: при интенсивности ультразвука 100 Вт/см² (2А), 133 Вт/см² (2В), 200 Вт/см² (2С); обработанного при постоянной интенсивности (100 Вт/см²), но варьировании ПАВ: при использовании ионогенного (2В') и неионогенного ПАВ (2В").

При ультразвуковой обработке наблюдается потеря активности полисахарида в тестах ТВ, АЧТВ по сравнению с нативным фукоиданом. АЧТВ-тест показал, что антикоагулянтная активность возрастает с увеличением интенсивности ультразвукового воздействия. Более высокая активность при этом отмечена для образца 2С, который удлинил время коагуляции в 1,18 раза по сравнению с отрицательным контролем. Антикоагулянтная активность в тесте ТВ была снижена для 2А на 4,12, 2В – на 8,25 % относительно активности образца исходного фукоидана (Таблица 5). Наблюдаемое снижение активности для 2А и 2В, т. е. при снижении размера, а соответственно молекулярной массы, подтверждается в работе E. Lahrson, A.-K. Schoenfeld, S. Alban [117].

Таблица 5 – 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

Время формирования тромба в ТВ-тесте увеличивается для образцов в порядке 2В>2А>2С>2В'>2В''. Активность полисахарида после обработки ультразвуком с величиной амплитуды 20, 40, 80 % от рабочего цикла, падает в связи с понижением степени сульфатированности, что согласуется с результатами, полученными J.Wang с соавторами [59]. Однако при интенсивности ультразвука 200 Вт/см² наблюдается увеличение, что может быть связано с понижением размера и соответственно молекулярной массы полисахарида с ростом соотношения общего количества сахаров к количеству сульфатных групп. Все образцы показали способность продлевать время свертывания плазмы человека *in vitro*.

Более высокие показатели антикоагулянтной активности для полисахаридов, полученных в результате УЗ-обработки в присутствии ПАВ, могут быть связаны, с

одной стороны, с увеличением отрицательного заряда поверхности полисахаридных частиц, что, в свою очередь, приводит к снижению функциональной эффективности ферментных комплексов факторов свертывания крови, а с другой – с увеличением кинетической гибкости цепи полисахарида.

В целом, все образцы показали высокую антикоагулянтную активность с использованием нормальной плазмы человека, однако значительно меньшую по сравнению с гепарином, как и в работе К. Matsubara, Y. Matsuura, A. Basic и др. [274]. Из литературных данных известно, что фукоидан способен ингибировать как внутренние, так и внешние пути свертывания крови [275]. Механизм влияния фукоидана на тромбиновое время связан с ингибированием активности тромбина или фибрина, а именно ингибированием реакции тромбин-фибриноген через гепарин-кофактор II-опосредованную активность [276] и ингибированием биологической активности сериновых протеаз II, X и VII [277]. В то же время при агрегации тромбоцитов фукоидан воздействует только на тромбин без оказания проагрегационного эффекта [278,279]. Однако в поздних исследованиях указывается, что механизм антикоагулянтного действия полисахарида не вызван изменением активности антитромбина III и кофактора II гепарина [274], а связан со степенью сульфатированности, молекулярной массой, количественным соотношением остатков сахаров и сульфатных групп [280]. Для проявления антикоагулянтной активности фукоидану необходима длинная полисахаридная цепь с высокой молекулярной массой и конформацией, удобной для связывания тромбина [38]. Так, низкомолекулярный фукоидан ингибирует тромбин посредством активации антитромбина и кофактора II гепарина, тогда как высокомолекулярный фукоидан взаимодействует непосредственно с тромбином [278]. Благодаря более низкой антикоагулянтной активности по сравнению с гепарином, а также лучшей абсорбционной способности [278] полученный фукоидан может быть использован в разработке средств для тромболитической терапии.

Выводы

Таким образом, при ультразвуковой обработке фукоидана с варьированием состава среды и интенсивности воздействия наблюдается различный механизм сонолиза. В присутствии ПАВ в системе наблюдается преобладание механического процесса деструкции, в то время как при их отсутствии помимо механического эффекта сонолиза проявляется и радикальный механизм деполимеризации. Также выявлено влияние высокоинтенсивного низкочастотного ультразвукового воздействия на степень сульфатированности, а также биологическую активность фукоидана. Предложен механизм деполимеризации. Выявлено достоверное снижение степени сульфатированности независимо от способа проведения ультразвуковой обработки. При определении пути ингибирования коагуляционных процессов подтверждено влияние обработанного фукоидана на внешний и внутренний пути свертывания крови. В результате были определены и подобраны оптимальные условия ультразвукового воздействия (интенсивность, время, ПАВ) для деструкции полисахарида.

Сонохимическая обработка фукоидана является экологически чистым, дешевым и эффективным методом модификации полисахарида, может быть использована для получения его наноразмерных молекул с предсказуемой активностью.

3.2. Стратегии функционализации фукоидана наночастицами магнетита

Нанобиокомпозиты как нанокомпозиты, содержащие природные полимеры в сочетании с неорганическими фрагментами, представляют собой отдельный класс соединений, обладающих улучшенными функциональными свойствами, и представляют собой новую группу наноструктурированных гибридных материалов [281,282]. Использование полисахаридов для создания таких структур позволит соответствовать принципам «зеленой химии» при их формировании, выступая в

качестве альтернативы синтетическим полимерам, и исключает применение токсичных растворителей [1]. Из литературных данных известно о широком спектре биологической активности полисахаридов, а наличие в их структуре нескольких реакционноспособных групп на каждое звено позволяет формировать устойчивые комплексы со многими соединениями. В то же время создание композитов с применением наночастиц металлов, их оксидов также вызывает повышенный интерес благодаря проявлению уникальных физико-химических свойств, в том числе наличие неорганического компонента позволяет осуществлять регуляцию системы нацеливания с помощью ультразвукового, магнитного или иного воздействия [1,283].

Поэтому вопрос создания нанобиокомпозитов, содержащих полисахарид в качестве матрицы в сочетании с неорганическими наночастицами магнетита, представляет большой интерес в области разработок систем доставки лекарственных средств.

Наиболее применяемым способом получения нанобиокомпозитов с применением полисахаридов можно выделить синтез магнитных наночастиц (МНЧ) в структуре полисахарида [284]. Однако синтез наночастиц в условиях введения макромолекул полисахарида приводит к формированию композита, имеющего достаточно большие размеры частиц (0,4–0,7 мкм [285]) в результате неоднородной кластеризации и агрегации частиц, что приводит к изменению свойств конечного продукта и является существенным ограничением их применения в разработке систем доставки лекарственных веществ. Спрей-метод позволяет получить сферические гранулы размером 4–20 нм с наночастицами магнетита внутри [286]. Однако такой метод применим только к полисахаридам, способным образовывать гелеобразные структуры.

Еще одним способом формирования нанобиокомпозитов на основе полисахаридов является электростатическое взаимодействие с неорганическими наночастицами. В водных системах поверхность наночастиц магнетита вследствие гидратации полностью покрыта Fe-OH группами [287]. В свою очередь, фукоидан способен взаимодействовать своими функциональными группами с

поверхностными гидроксильными группами магнетита с образованием стабильных соединений, поэтому возможна самоорганизация при механическом смешивании готовых наночастиц и раствора полисахарида после сонохимической обработки с образованием нанобиокомпозитов с контролируемым размером. В связи с этим в последующей работе была выбрана именно данная стратегия синтеза нанобиокомпозита фукоидан/магнетит (Рисунок 18). Важно и то, что в разработке систем доставки в комбинации с наночастицами магнетита фукоидан использовался лишь как покрытие последних и не было проведено исследований по включению его в структуру полисахарида. В ходе поиска системы доставки нами были получены фукоидансодержащие носители на основе электростатического взаимодействия с белком, реакцией Майяра, путем внешнего и внутреннего гелеобразования, а также с помощью сшивающих агентов, включением в ниосомальную структуру однако добиться необходимой размерности и степени включения модельного белка, а также таргетности доставки не удалось.

При разработке таргетной магнитоуправляемой системы доставки важно и то, что сами магнитные частицы физиологически инертны, однако при размере 50 нм быстро выводятся из организма [288], но в то же время при внутрисосудистом применении препарата для исключения эмболии размер носителя не должен превышать 200 нм [289,290].

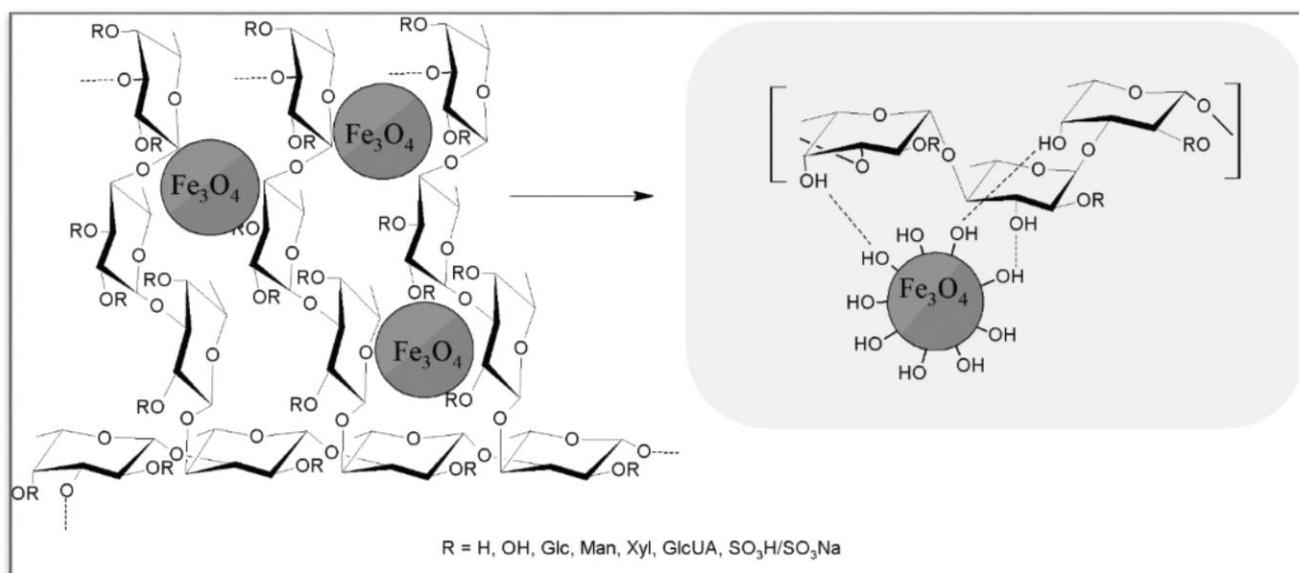


Рисунок 18 – Предполагаемая схема строения фукоидана, функционализированного магнетитом

Синтез нанобиокompозита на основе фукоидана

На данном этапе работы планировалось формирование нанобиокompозита как матрицы-носителя ТАП путем:

а) сочетания полученных после УЗ-обработки частиц фукоидана с наночастицами магнетита. В результате самоорганизации предполагалось получение частиц с формой, близкой к сферической (ФМ25, ФМ50, ФМ100, ФМ150);

б) УЗ-обработки нативного фукоидана при интенсивности 133 Вт/см² в присутствии наночастиц магнетита (УЗ-ФМ).

Измерения размера частиц с помощью ДРС, полученных при сочетании сонохимически деполимеризованного фукоидана с магнитными наночастицами (МНЧ), показали, что гидродинамический диаметр наночастиц композита варьируется от 227,4±23,7 до 126,3±14,6 нм (Таблица 6). Увеличение концентрации фукоидана в системе приводит к росту гидродинамического диаметра формируемого композита в связи с тем, что помимо взаимодействия МНЧ Fe₂O₃ с полисахаридными цепями фукоидана осуществляется межмолекулярная

многократная ассоциация фукоидан – фукоидан и фукоидан – композит с образованием агрегатов. Последнему процессу также способствует наблюдаемое снижение электрохимического потенциала. Функционализация фукоидана магнетитом приводит к повышению дзета-потенциала с $-7,05 \pm 0,16$ мВ до максимального $12,46 \pm 0,81$ мВ, что облегчит дальнейшую иммобилизацию ТАП.

Таблица 6 – Свойства нанобиокомпозита фукоидан/магнетит

Соотношение магнетит: фукоидан	Гидродинамический диаметр, нм	ζ - потенциал, мВ	Содержание Fe_2O_3 , %	Содержание фукоидана, %	Выход нанобиокомпозита, %
ФМ25	$148,6 \pm 21,7$	$10,7 \pm 0,64$	$82,4 \pm 5,6$	$20,5 \pm 3,9$	28,75
ФМ50	$154,9 \pm 20,6$	$8,44 \pm 0,25$	$73,2 \pm 2,9$	$29,8 \pm 4,2$	15,24
ФМ100	$187,5 \pm 34,5$	$7,66 \pm 0,39$	$71,8 \pm 3,4$	$26,7 \pm 5,3$	14,47
ФМ150	$227,4 \pm 23,7$	$7,06 \pm 0,17$	$65,5 \pm 4,7$	$37,4 \pm 4,9$	9,08
ФМ-УЗ	$119,9 \pm 14,5$	$12,46 \pm 0,81$	$77,6 \pm 3,2$	$25,5 \pm 2,1$	14,71
МНЧ	$32,5 \pm 9,6$	$28,54 \pm 0,72$	–	–	–
Частицы фукоидана	$85,9 \pm 32,9$	$-9,83 \pm 0,16$	–	–	–

Количество включенного магнетита определяли гравиметрическим анализом после термического разложения композита, где деградация полисахарида осуществлялась при 200 °С. Включение фукоидана в композит оценивали через количество полисахарида в супернатанте. Больше количество включённого магнетита наблюдается для образцов ФМ-УЗ и ФМ25. Кроме того, результаты

показали, что лучшим массовым соотношением полисахарид:магнетит, подходящим для приготовления магнитных нанокompозитов, характеризуемое высокой степенью включения магнетита и наименьшим размером, обладают также образцы ФМ-УЗ и ФМ25 (Таблица 6). Высокий процент содержания полисахарида в полученных системах может обеспечить высокую биологическую активность и биосовместимость композита [291].

При взаимодействии магнетита с нативным полисахаридом в условиях высокочастотного ультразвукового воздействия (УЗ-ФМ) на первых этапах (в течение первых 10 мин) процессы агрегации преобладают, образуются крупные агломераты (Рисунок 19 и 20 а).



Рисунок 19 – Изменение стабильности коллоидной системы «нативный фукоидан/магнетит» при высокочастотном ультразвуковом воздействии

Формирование крупных образований в результате агрегационных процессов приводит к неустойчивой коллоидной системе, однако при увеличении времени воздействия до 40 мин происходит разрушение сформированных комплексов с возникновением частиц меньшего размера (Рисунок 20 б–г), а увеличение дзета-потенциала приводит к замедлению процессов коагуляции.

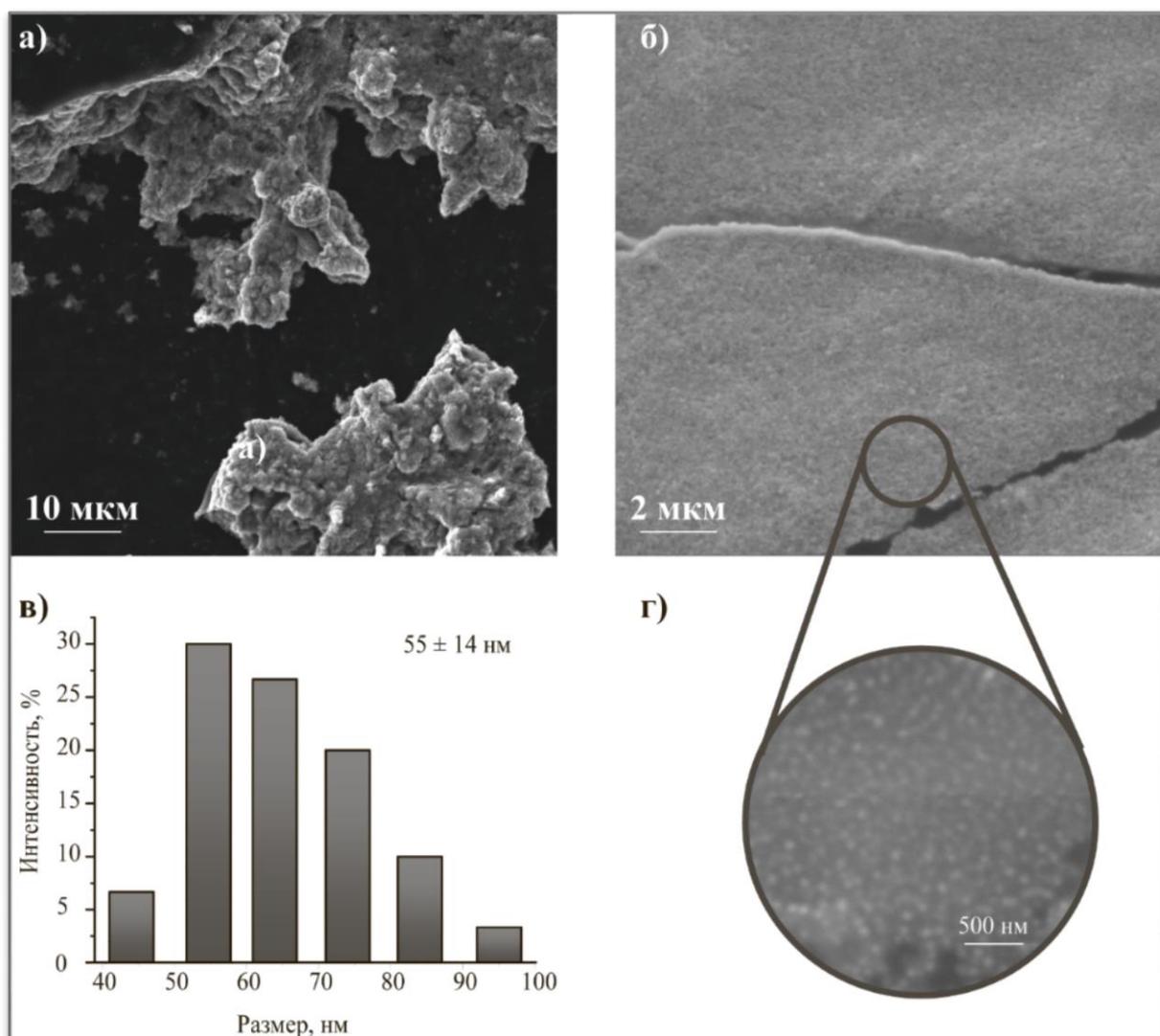


Рисунок 20 – Размер и морфология нанобиокompозита, полученного при высокоинтенсивном низкочастотном ультразвуковом воздействии на золь «нативный фукоидан/магнетит»:

- а) – СЭМ-изображение после 10 мин ультразвукового воздействия (40 % рабочей амплитуды) на смесь фукоидан/магнетит;
- б), г) – СЭМ-изображение после 40 мин ультразвукового воздействия (40 % рабочей амплитуды) на смесь фукоидан/магнетит;
- в) – распределение частиц полученного нанобиокompозита по размеру (СЭМ)

3.3. Биокompatный материал как носитель тканевого активатора плазминогена

Таргетирование ЛВ может быть осуществлено двумя методами: с помощью внешнего физического воздействия или путем химического наведения с последующим контролируемым выпуском фермента в результате запуска внешнего или внутреннего механизма вследствие изменения таких факторов, как рН среды, температуры, red-ox потенциала и т. д. [237,292,293]. Идея таргетирования лекарственных веществ с помощью магнитного поля была предложена еще в 60-х гг. XX в.

Особенностью в разработке способа доставки ТАП является необходимость создания системы, в условиях которой будут отсутствовать стерические факторы, препятствующие взаимодействию ТАП с плазминогеном и фибрином. Поэтому более применимыми являются методы иммобилизации на поверхности переносчика путем ковалентного или нековалентного взаимодействия [294]. При этом ковалентная иммобилизация может привести к увеличению стабильности иммобилизуемого фермента, но с одновременным снижением эффективности его действия за счет блокирования сайта связывания или конформационных ограничений [218,219]. Стабилизация ТАП за счет образования ковалентных связей по сравнению с абсорбцией на носителе приводит к росту фибринолитической активности фермента. Кроме того, в связи с коротким временем действия ТАП в кровеносном русле существует необходимость разрабатывать системы не только его доставки для осуществления селективного тромболитика, но также и протекции фермента с повышением биодоступности.

Существует широкий спектр веществ, позволяющих осуществить иммобилизацию с помощью ковалентных связей, варьируемых в зависимости от рН, среды, температурных режимов, свойств подложки или матрицы [220]. Так, иммобилизация рекомбинантного ТАП на силанизированный магнетит осуществима с помощью sulfo-NHS [221]. Известно, что такой способ иммобилизации приводит к увеличению стабильности фермента, однако

наблюдается снижение эффективности [218,219]. В данной работе в качестве сшивающего компонента для ковалентной иммобилизации тромболитического фермента был взят бифункциональный поперечносшивающий агент – глутаровый альдегид, достоинством которого является его доступность, дешевизна и высокая растворимость в воде.

Таким образом, иммобилизация ТАП была осуществлена в водном растворе двумя способами: адсорбцией и химической сшивкой с поверхностью сформированных носителей с помощью глутарового альдегида. Химическая сшивка реализовывалась за счет межмолекулярной конденсации с гидроксильными группами молекул полисахарида и белка, а также свободными аминогруппами белка (Рисунок 21). Растворитель при этом удаляли сушкой в вакуумном эксикаторе.

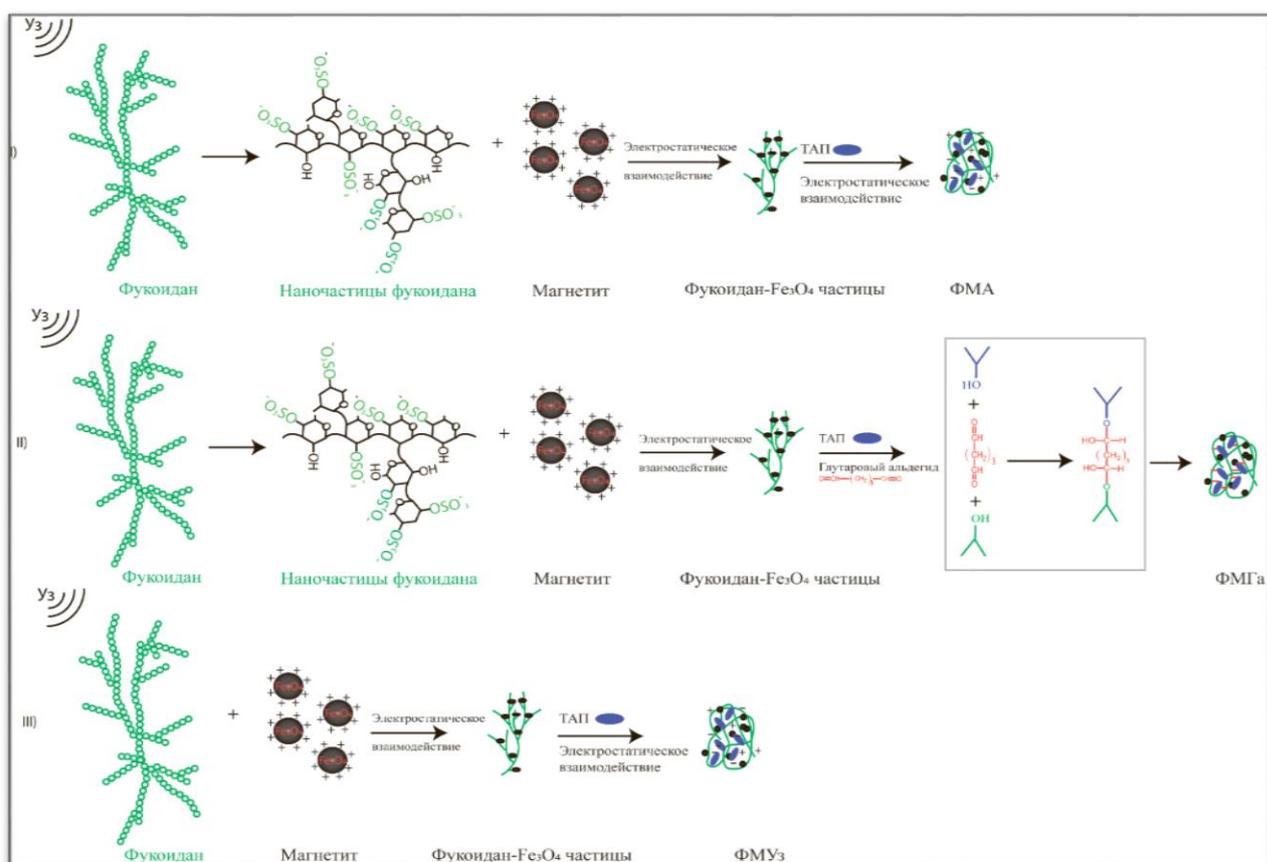


Рисунок 21 – Механизмы формирования нанобиокompозитов и иммобилизации ТАП

В результате проведения работ на данном этапе предполагалось получить нанобиокомпозит с иммобилизованным ферментом за счет образования связей ковалентной или нековалентной природы с сохранением ферментативной активности последнего. Сформированные полимерно-оксидные нанобиокомпозиты позволят осуществить локализацию ТАП в области тромба за счет воздействия внешнего магнитного поля (Рисунок 22) и взаимодействия носителя с Р-селектином, т. е. синергетически объединить активный и пассивный таргетинг, а также осуществить защиту ТАП от инактивации ингибитором ИАП1.

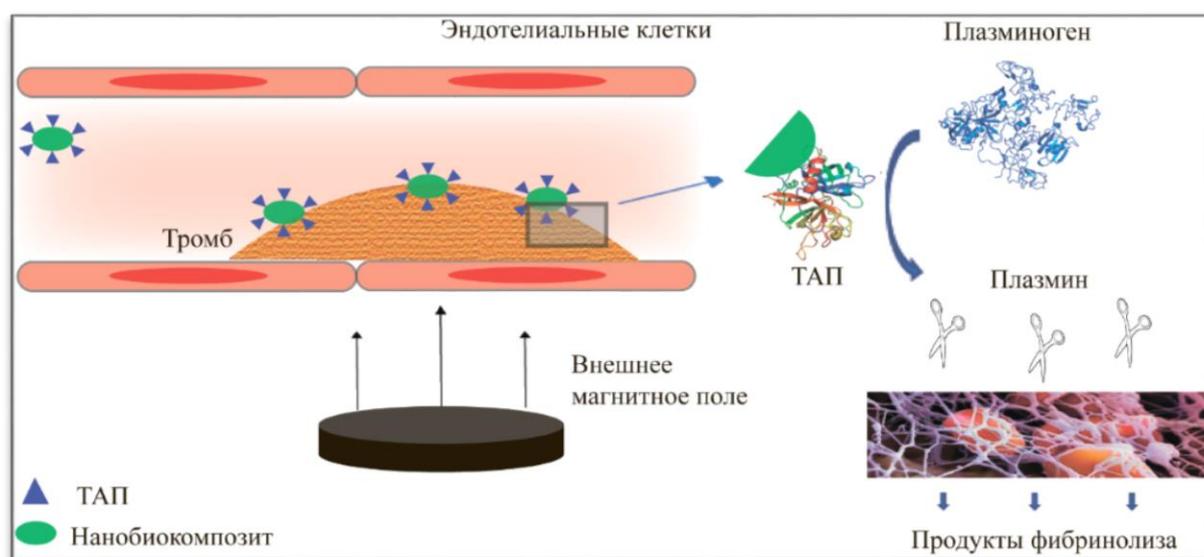


Рисунок 22 – Механизм действия нанобиокомпозита с иммобилизованным ТАП

3.3.1. Морфология и размер частиц бионанобиокомпозита с иммобилизованными молекулами фермента

Адсорбция тромболитического агента осуществлялась за счет электростатического взаимодействия образцов функционализированного фукоидана, полученный, несущими положительный заряд, и молекул фермента. С синтезом образцов ФМА и ФМУз (где ФМА-образец бионанобиокомпозита полученный при смешивании частиц деполмеризованного фукоидана с золев

магнетита в соотношении 2,5:1 с иммобилизованным ТАП; ФМУз - образец бионанокompозита, полученный после ультразвуковой обработки исходного фукоидана в присутствии МНЧ с последующей иммобилизацией ТАП). Ковалентная иммобилизация ТАП была реализована с применением глутарового альдегида (образец ФМГа). Глутаровый альдегид позволит иммобилизовать ТАП не только за счет связывания с доступными гидроксильными группами фукоидана, но и с поверхностными гидроксильными группами магнетита.

ТАП представляет собой глобулярный белок с молекулярной массой 72 кДа и дзета-потенциалом $-9,7$ мВ [217]. Наблюдаемый отрицательный дзета-потенциал частиц при загрузке ТАП (Таблица 7) согласуется с данными, полученными в работе T. W. Chung, S. S. Wang, W. J. Tsai [210]. Электростатическое отталкивание отрицательно заряженной поверхности полученных нанокompозитов, содержащих фермент, и отрицательно заряженной поверхности клеток крови позволит избежать агрегации с кровяными тельцами и исключить их клеточное поглощение [295].

Размер нанобиокompозитов был оценен с помощью ДРС на образцах с концентрацией композита 5 мг/мл. Гидродинамический диаметр изменяется при варьировании состава среды и способа формирования частиц. Максимальное среднее значение 369,7 нм наблюдается для частиц нанобиокompозита с ковалентно иммобилизованным ТАП (ФМГа). Причиной повышения размера может являться агрегирование в результате слабого поверхностного заряда композита (всего $-1,66 \pm 0,06$ мВ), приводящего к слабому электростатическому отталкиванию между наночастицами [294]. Электростатическое отталкивание между частицами за счет введения ПАВ позволило уменьшить возможность агрегации, что привело к снижению размера (Таблица 7). Индекс полидисперсности характеризует распределение частиц по размеру, его значение определяет гомогенность или гетерогенность системы. Чем ниже значение индекса полидисперсности, тем ближе система к монодисперсному состоянию. Расчет индекса осуществлялся в соответствии с работой Н. К. Козлова с соавторами [296]. В полученных образцах дисперсная система гомогенна в связи с низким значением (менее 0,3) индекса полидисперсности.

Таблица 7 – Обобщенные данные полученных типов нанобиокompозитов с иммобилизированным ферментом

Тип биокompозита	0,1М 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

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 (Рисунок 23 а). Более худший показатель выявлен для ФМУз, что может быть связано с изменением свойств поверхности при высокоинтенсивном ультразвуковом воздействии. Высокие значения стандартных отклонений могут указывать на низкую агрегационную устойчивость [234]. Изменения поверхностных свойств коллоидов также зависят от pH среды. При иммобилизации 1 мг/мл белка наблюдается снижение дзета-потенциала с максимального значения 12,46±0,81 (для ФМУз) до минимального -9,01±0,21 мВ (для ФМУз), при этом поверхностный заряд снижается с ростом значения pH (Рисунок 23 б), что свидетельствует об успешной иммобилизации тромболитического агента.

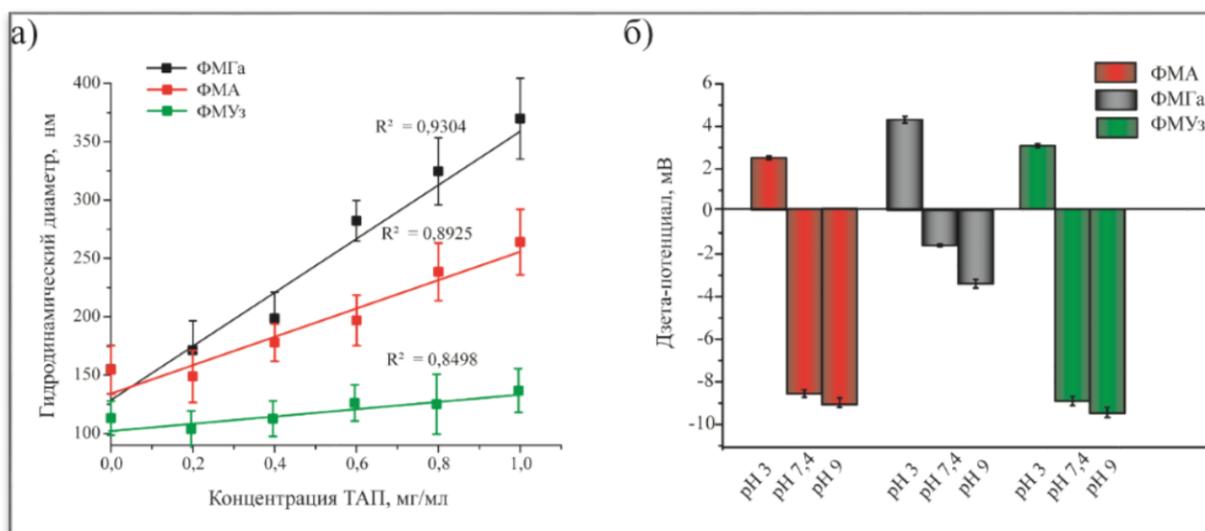


Рисунок 23 – Зависимость значения гидродинамического диаметра композита от концентрации ТАП (а) и электрокинетического потенциала от уровня pH (б)

Морфология и размер нанокompозитов фукоидан/магнетит, содержащих ТАП, были рассмотрены и с помощью СЭМ (Рисунок 24). Вследствие ассоциации и усадки в процессе сушки перед СЭМ композиты имели форму крупных агрегатов.

Исходя из того, что в соответствии с данными, полученными с помощью СЭМ, размер исходных неорганических наночастиц был в пределах 10, фукоидановой матрицы – $38,4 \pm 5,4$, а образованных композитов, от $81,3 \pm 18,1$ (для ФМУз) до $94,4 \pm 24,3$ нм (для ФМГа), то возможно формирование нанобиокompозита, где на одну макромолекулу полисахарида приходится несколько частиц магнетита.

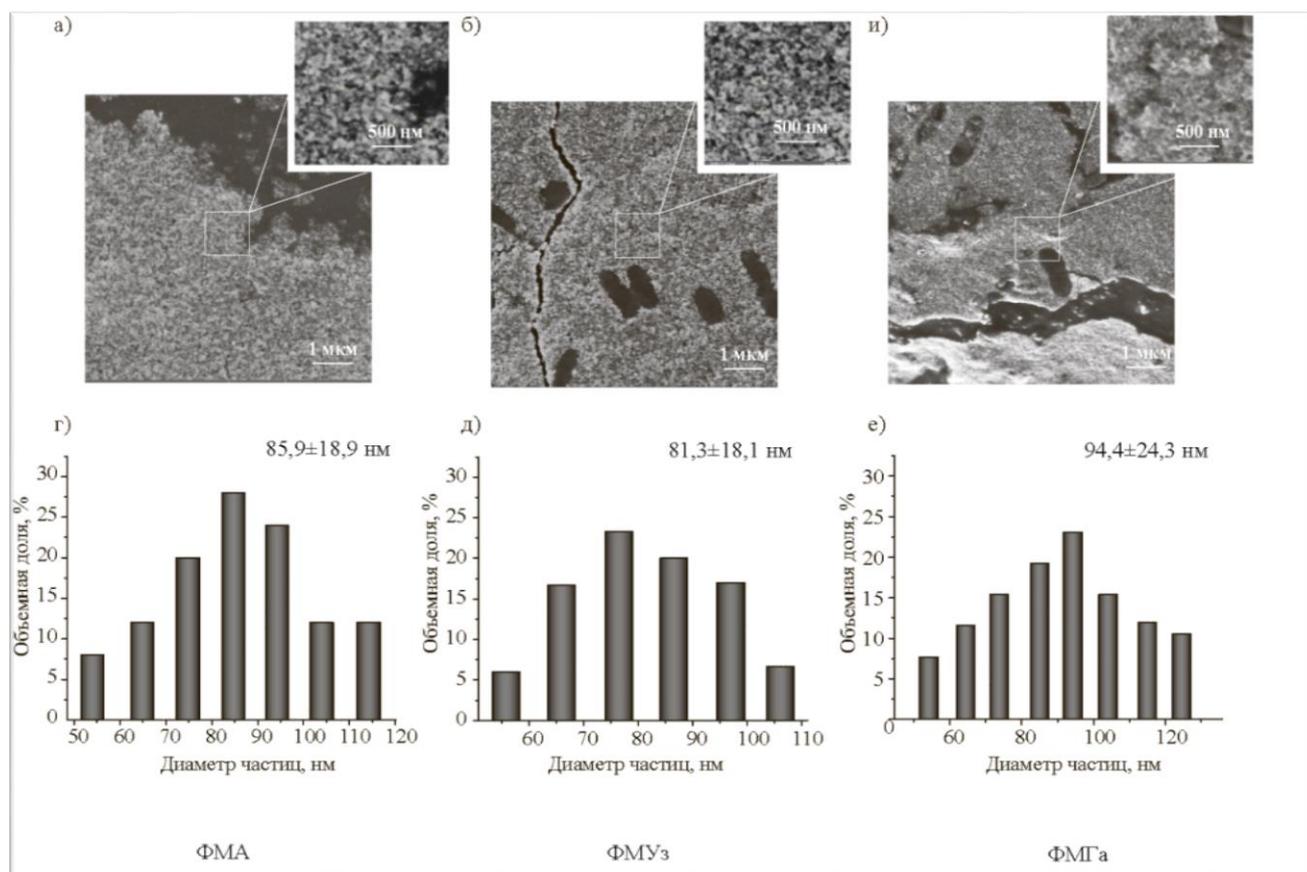


Рисунок 24 – Частицы нанобиокomпозитных материалов ФМА, ФМУз, ФМГа:

а), б), в) – СЭМ-изображения бионанокomпозитов с иммобилизированным тромболитическим агентом;

г), д), е) – распределение по размеру частиц биокomпозитных материалов

Уменьшение среднего диаметра частиц при изучении образцов методом электронной микроскопии по сравнению с данными, полученными с помощью динамического рассеяния света, обусловлено наличием гидратной оболочки при измерении методом ДРС, так как исследование в данном методе проводилось в растворе. Кроме того, в методе ДРС частицы схожих размеров плохо различимы, но в то же время вклад в интенсивность для частиц разного размера различен (с увеличением размера он повышается). Таким образом, размер наночастиц биокomпозита зависит от выбранного способа иммобилизации, и, несмотря на различия в показателях гидродинамических диаметров и диаметров, полученных с помощью СЭМ, изменения размера соответствуют друг другу в обоих случаях.

3.3.2. Исследование магнитных характеристик нанобиокомпозитов

Для успешного применения полученных нанобиокомпозитов и рассмотрения возможности осуществления манипулирования частиц в условиях сопротивления скорости кровотока и диффузионных процессов следует изучить влияние изменения магнитного поля, так как точное нацеливание нанобиокомпозита, несущего тромболитический агент к целевому участку с целью повышения эффективности действия фермента, а также снижения системной токсичности препарата, предполагалось осуществить с помощью воздействия внешнего магнитного поля. Поэтому необходимо было исследовать отклик полученных систем на градиент магнитного поля путем анализа кривых намагничивания [291].

Измерение намагничиваемости наночастиц полученных бionанокompозитов и МНЧ произведено при 300 К (Рисунок 25).

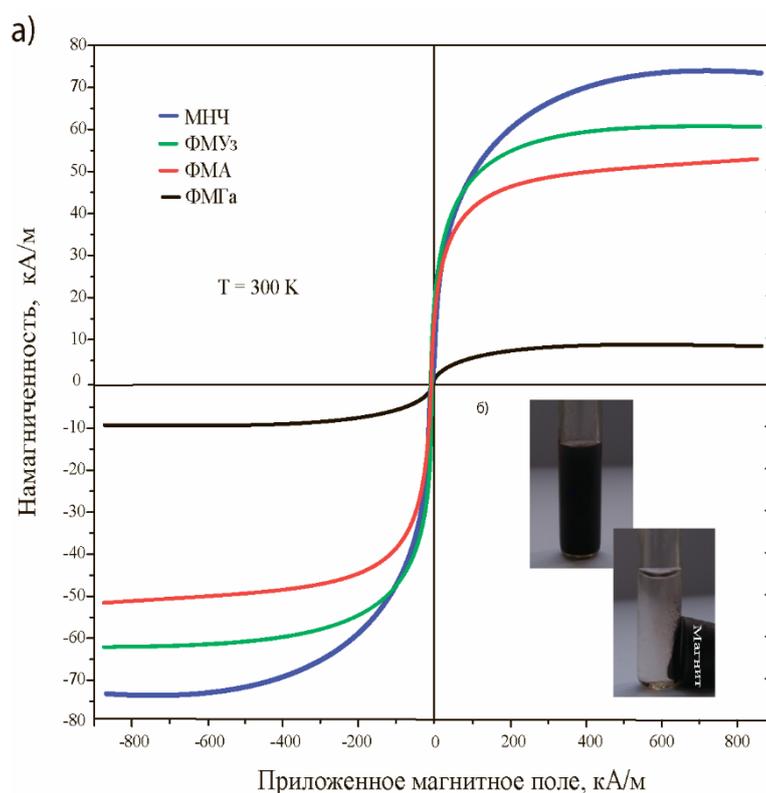


Рисунок 25 – Намагничивание образцов нанобиокомпозита:

а) – кривые намагничивания нанобиокомпозитов, содержащих тромболитический агент;

б) – суспензия образца ФМА в воде (10 мг/мл) при отсутствии и воздействии внешнего магнитного поля

Кривые образцов указывают на суперпарамагнитное поведение с нулевой остаточной магнитной индукцией [222,297] 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 [2,298]), 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 [181,299]. В связи с тем, что для измерения были взяты образцы одинаковой массы, но различным соотношением магнетит/используемые полимеры, количество магнетита в каждом образце может отличаться, поэтому данные рассматриваются только в первом приближении [300]. В то же время фукоидан в отличие от других полисахаридов, имеющих сульфогруппы и повышающих вязкость раствора, гелеобразующими свойствами не обладает, значит, проблема сшивки макромолекул с образованием жесткой структуры, приводящая к снижению магнитных свойств, отсутствует.

3.3.3. Высвобождение тромболитического агента

При разработке таргетной системы доставки с магнитным наведением важной характеристикой является скорость высвобождения активного тромболитического агента из полисахарид-оксидного носителя. Высвобождение фермента из такой матрицы осуществляется за счет диффузионных процессов, а приложенное магнитное поле может подавлять взаимодействие с носителем, ускоряя диффузию [281,301] в результате механической деформации.

Фермент загружали в нанокомпозит путем физической адсорбции и химической иммобилизации с помощью сшивающего агента.

Для получения профиля релиза фермента были использованы опытные системы ФМА, ФМУз, ФМГа, содержащие ТАП, где качестве среды для высвобождения были использованы раствор 0,1 М ФСБ (рН 7,4). Определение степени и скорости высвобождения фермента из образцов биокомпозита осуществляли *in vitro* при перемешивании при температуре $37\pm 0,5$ °С путем установления количества фермента в модельной среде спектрофотометрическим методом, используя калибровочный график стандартных растворов БСА.

Загруженные полимерные магнитокомпозиты проявили разную способность удерживать ТАП. В соответствии с полученным экспериментальным кинетическим профилем высвобождения ТАП из сформированных наночастиц в модельную среду наблюдается двухступенчатый характер выпуска. Сильное начальное высвобождение фермента (Рисунок 26), 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.

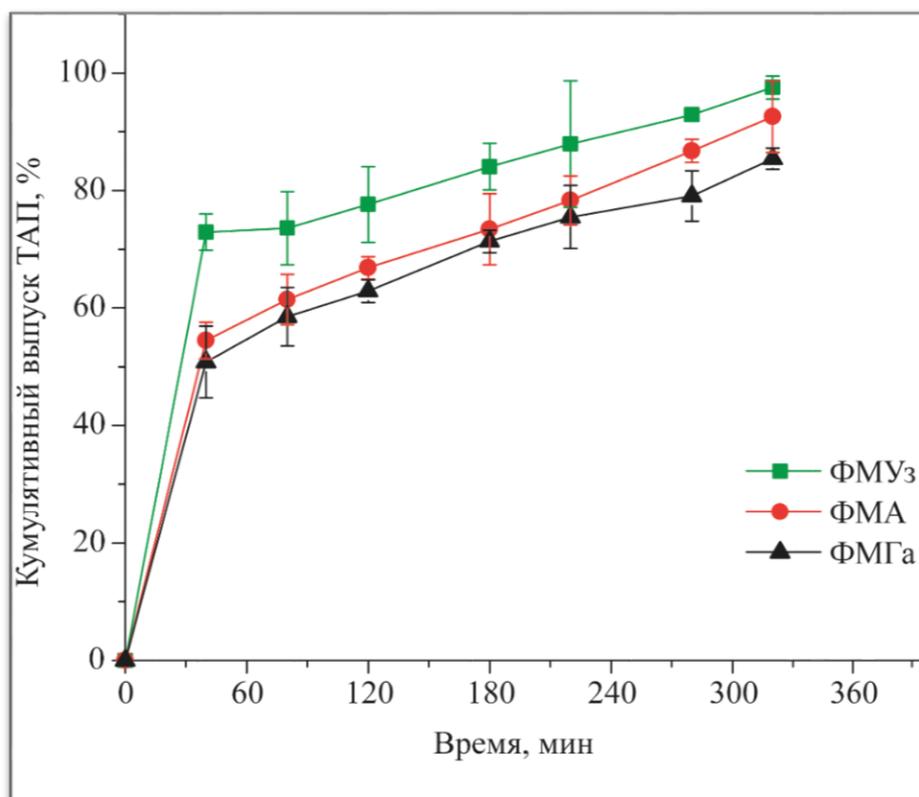


Рисунок 26 – Профиль выпуска ТАП при варьировании типа носителя

Бёрст-эффект может быть связан с ионным обменом в растворе, приводящим к ослаблению взаимодействия в системе фукоидан – магнетит – ТАП, что также отмечается в работе J. P. Chen с соавторами [231]. Первоначальный выпуск более 50 % достаточен для растворения сформированных тромбов, а последующее более медленное высвобождение оставшегося ТАП способствует предотвращению образования новых тромбов [212]. ФМГа демонстрирует самый медленный и наименьший кумулятивный выпуск тромболитического агента среди всех образцов биокompозитов 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. Таким образом, наблюдается пролонгированное высвобождение тромболитического фермента в течение 6 ч для всех образцов носителей.

3.3.4. Количество и активность иммобилизованного ТАП

Эффективность включения ТАП определяли косвенным путем в трех независимых измерениях в надосадочной жидкости. Количественная оценка содержания ТАП в надосадочной жидкости, включающей в себя супернатант всех этапов промывки, осуществлялась спектрофотометрически по Бредфорду. Оценка содержания ТАП, дающая представление о целостности структуры белка в нанокompозитах, осуществлялась с помощью SDS-PAGE электрофореза по методу Лэммли, с окрашиванием Кумасси G-250 после их разрушения. Значение СВ представляет массовый процент иммобилизованного фермента, а значение ЭВ дает весовой процент ТАП в нанобиокompозите [231].

В отличие от метода ковалентного связывания фермента образец, полученный после деструкции нанокompозита, содержащего адсорбированный фермент, показал определяемые количества ТАП, что свидетельствует о более высокой степени включения белка (Рисунок 27). Как видно из рисунка, ТАП не был подвержен деструкции при формировании и при разрушении частиц, а также иммобилизация не привела к повышению его молекулярной массы за счет образования конъюгатов.

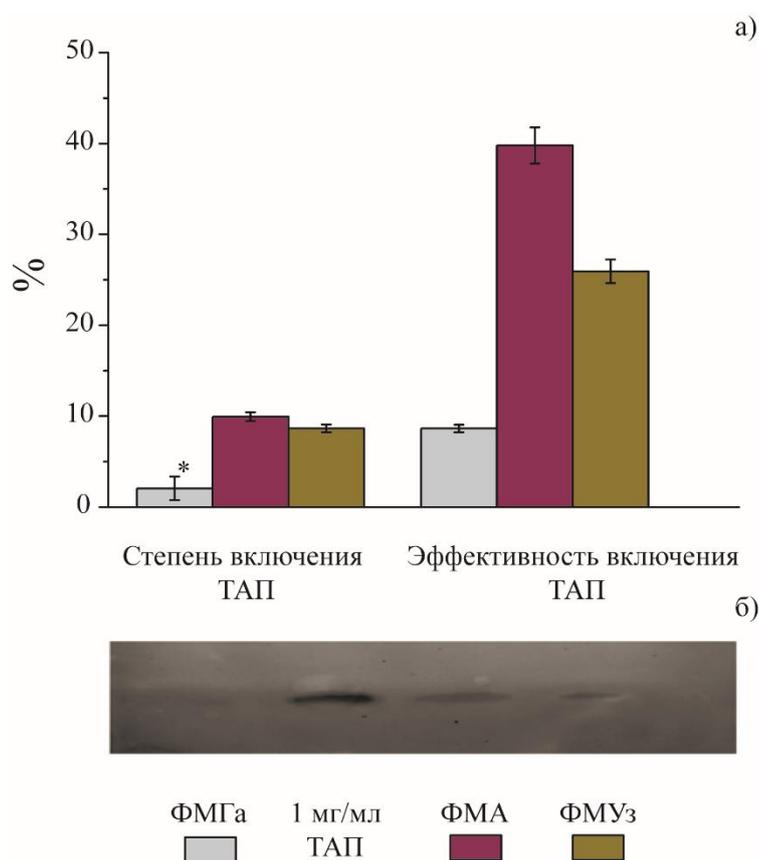


Рисунок 27 – Количество иммобилизованного тромболитического агента (*по результату 5 измерений):

- а) – зависимость СВ и ЭВ фермента от типа нанобиокомпозита;
 б) – определение эффективности связывания ТАП (окрашивание Кумасси G-250, ChemiDoc Imaging System)

Эффективность включения ТАП варьируется от $8,26 \pm 0,36$ до $39,79 \pm 0,2$ % при максимальной загрузке фермента от $2,06 \pm 0,09$ % (82,4 ед/мг для ФМГа) до $9,95 \pm 0,05$ % (398 ед/мг для ФМА). Эффективность включения ТАП понижается при попытке иммобилизации фермента на поверхности нанокompозита путем формирования ковалентных связей более чем на 31,53 %. Снижение загрузки ТАП для наночастиц ФМГа по сравнению с другими образцами может быть связано с увеличением конечной массы наночастиц при использовании глутарового альдегида. При формировании ФМГа количество ковалентно связанного ТАП в 4,83 и в 4,2 раза меньше по сравнению с адсорбцией на поверхности ФМА и ФМУз соответственно, что указывает на высокую адсорбционную емкость последних для

иммобилизации тромболитического агента. Высокая адсорбционная емкость ФМА и ФМУз может быть обусловлена их возможной высокой удельной поверхностью. Таким образом, результаты определения СВ и ЭВ показали низкую эффективность применения метода химической сшивки с помощью глутарового альдегида. Иммобилизация фермента за счет образования ковалентных связей приводит к снижению количественного содержания ТАП в полученных материалах, а также эффективности включения фермента более чем в 3 раза. Таким образом, большей способностью к иммобилизации тромболитического агента обладал образец, полученный за счет сил электростатического взаимодействия фукоидан – магнетит – ТАП.

Оценка амидолитической активности иммобилизованного 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.

Исследование ферментативной активности иммобилизованного в нанобиокомпозиты ТАП заключалась в изучении его амидолитической и фибринолитической активности. Амидолитическая и фибринолитическая активность фермента определяли *in vitro*.

Анализ амидолитической активности осуществляли с применением хромогенного субстрата, а фибринолитической активности – с применением фиксированных в агарозном геле фибриновых сгустков. Активность определяли также в трех независимых измерениях. Для определения каталитической активности иммобилизованного фермента были взяты образцы с конечной концентрацией 58 ед/мг.

Амидолитическая активность является одной из важнейших характеристик ТАП, отражает протеазную активность фермента на основе применения специфического хромогенного субстрата.

Определение амидолитической активности ТАП основано на способности фермента взаимодействовать с плазминогеном с формированием комплекса «ТАП – плазминоген» (Рисунок 28 (I)), который затем гидролизует амидную связь Glu-pNa в пептидном хромогенном субстрате (Рисунок 28 (II)) с высвобождением пара-нитроанилина (pNa), придающего раствору желтое окрашивание.

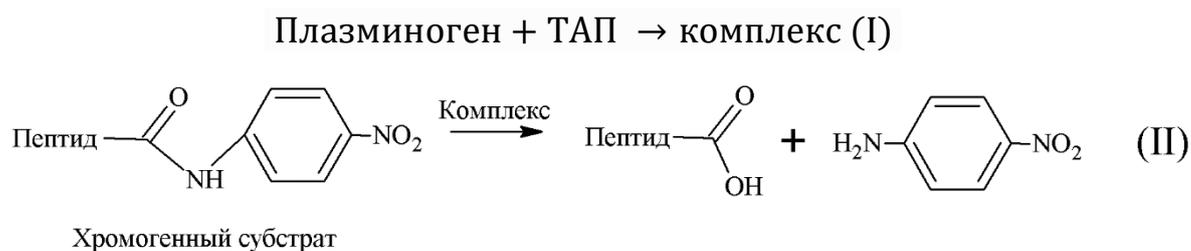


Рисунок 28 – Схема реакции определения амидолитической активности иммобилизованного тромболитического агента

Амидолитическая активность фермента, 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, приводящем к подавлению активности фермента. Однако электростатическое подавление ферментативной активности ТАП было не настолько сильным по сравнению с образованием ковалентных связей методом химической сшивки в результате использования глутарового альдегида.

Также ковалентно-связанный ТАП проявлял менее высокую амидолитическую активность по сравнению с другими образцами, которая была в 3,85 и 2,9 раза меньше, чем при адсорбции тромболитического агента на носителях ФМА и ФМУз соответственно. Снижение ферментативной активности ТАП при формировании ковалентных связей с помощью глутарового альдегида может быть связано с образованием стерических препятствий для активного центра фермента в результате неправильного сворачивания белка под действием формируемых связей.

Для определения ферментативной кинетики иммобилизованного и свободного фибринолитического агента определяли гидролизом хромогенного субстрата по изменению абсорбции п-нитроанилина в течение 1 ч (Рисунок 29).

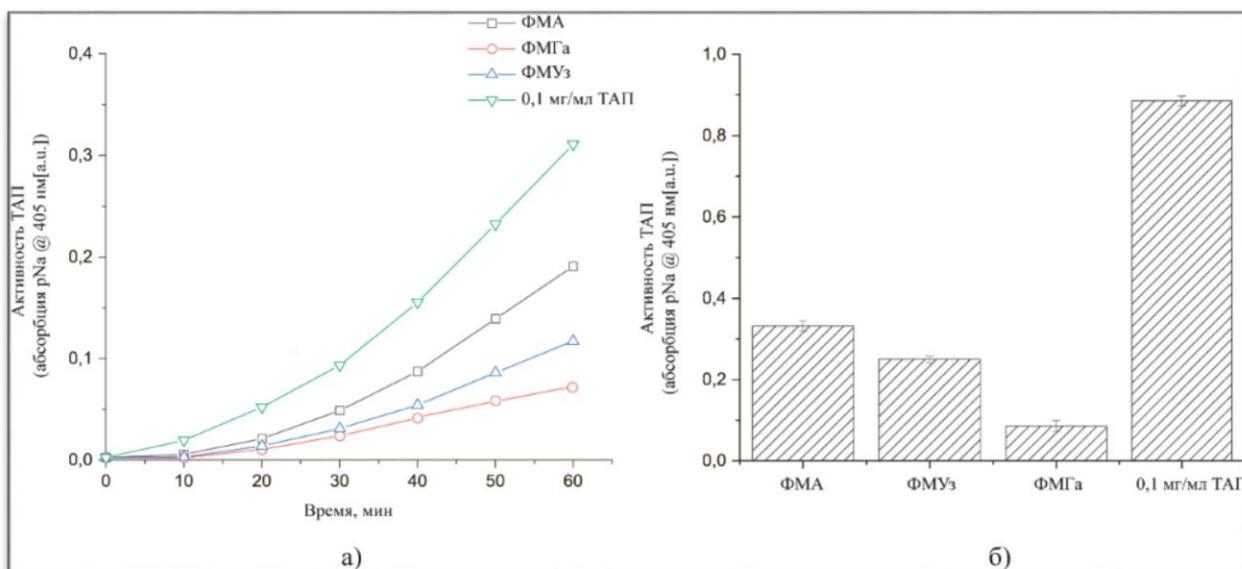


Рисунок 29 – Амидолитическая активность тромболитического фермента, определяемая гидролизом хромогенного субстрата по изменению абсорбции п-нитроанилина:

а) – усиление ТАП-катализируемого образования плазмينا в течение 1 ч;

б) – динамика изменения каталитической активности ТАП

в зависимости от типа нанобиокомпозита

Исходя из кинетических кривых также наблюдается снижение амидолитической активности связанного ТАП по сравнению со свободным. Среди факторов данного явления доминирующим может быть скорость высвобождения фермента из матриц. Снижение активности для ФМГа подтверждается кинетическими кривыми выпуска фермента.

Оценка фибринолитической активности иммобилизованного ТАП на моделях тромба

В связи с тем, что ТАП используют для гидролиза уже сформированных тромбов, прикрепленных к стенке сосудов, на данном этапе нашей целью явилось исследование фибринолитической активности иммобилизованного фермента на различных моделях готовых тромбов. Так, нами были использованы фибриновые сгустки, фиксированные на предметном стекле и в агарозном геле.

Фибриновый сгусток получали из контрольной плазмы человека, помещали на предметное стекло и сверху наносили заданное количество нанокompозита с иммобилизованным тромболитическим агентом. Динамику лизиса тромба наблюдали в течение 6 ч при 25 °С с помощью оптического микроскопа.

На модели, фиксированной на предметном стекле, было выявлено начало тромболизиса в статических условиях уже на 30-й мин от начала эксперимента. Максимальная деградация сгустка наблюдается через 300 мин взаимодействия фибриновый сгусток – нанокompозит.

Самое короткое время лизиса модельного тромбинового сгустка 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 30).

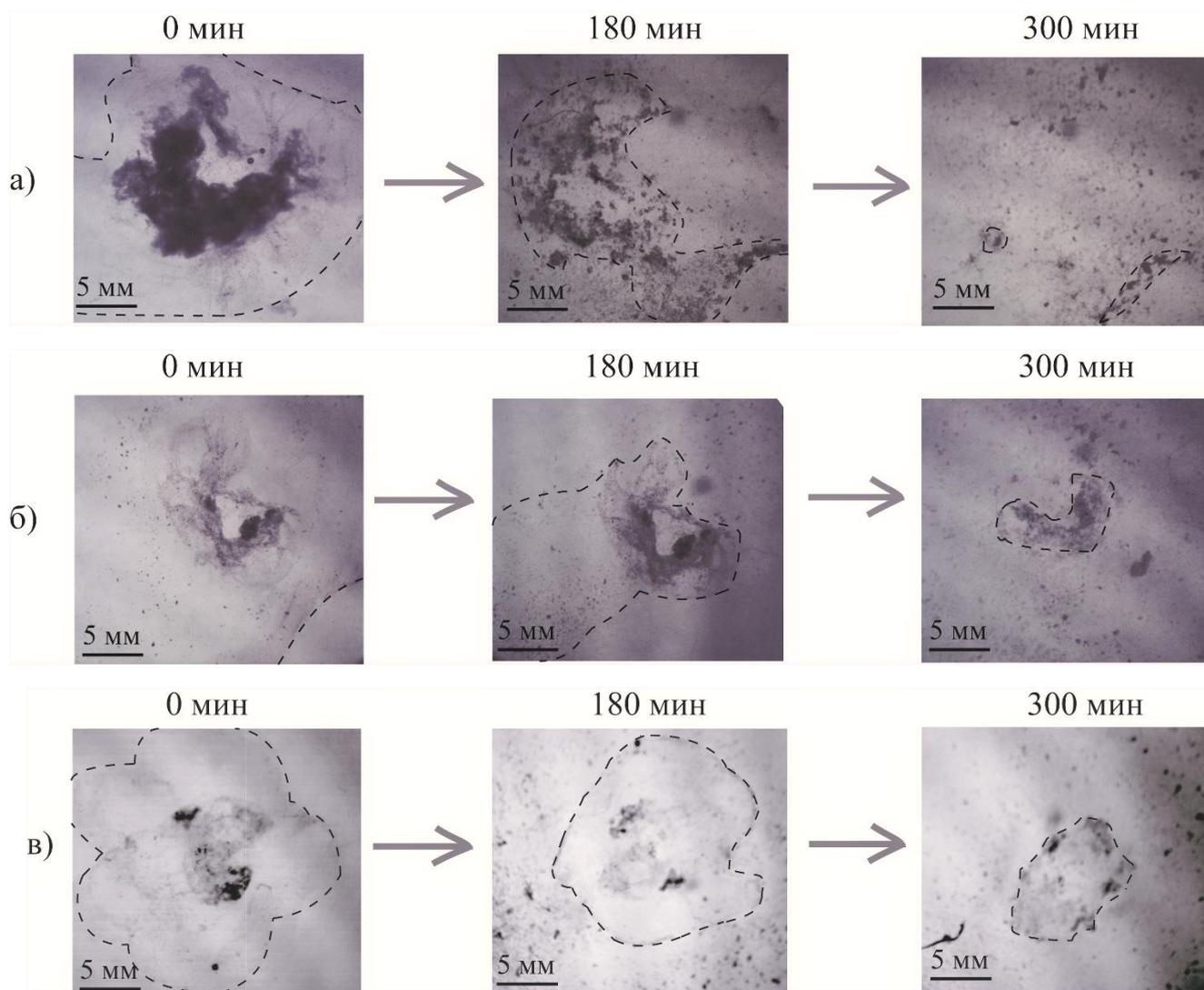


Рисунок 30 – Исследование динамики лизиса фибриновых сгустков в присутствии нанобиокомпозита с иммобилизованным ТАП с помощью оптического микроскопа:

- а) – фибриновый сгусток с нанесенным ФМА;
- б) – фибриновый сгусток с нанесенным ФМУз;
- в) – фибриновый сгусток с нанесенным ФМГа

Дзета-потенциал раствора фибриногена составляет $-38,4$ мВ при рН 7,4, поэтому основными факторами проникновения частиц нанокомпозита в фибриновый сгусток являются электростатические и лиганд-рецепторные взаимодействия между наночастицами и компонентами тромба (фибриновые субстраты, гликопротеин Пв / Ша мембраны тромбоцитов), а роль осмотического давления является второстепенной [226]. Кроме того, частицы до 320 нм,

содержащие ТАП, способны проникать в пористую структуру фибриновых сгустков с последующим выпуском фермента внутри тромба, что позволяет ускорить тромболизис [210,302]. Поэтому на первом этапе взаимодействия тромб – образец наночастиц, происходит адсорбция частиц, несущих отрицательный заряд на поверхности тромба, имеющего положительный заряд, затем осуществляется проникновение частиц в тело тромба под действием различных физических сил, сопровождаемое частичным выпуском ТАП (Рисунок 31). На последнем этапе осуществляется переход плазминогена в плазмин под действием ТАП с последующим лизисом фибринового сгустка. Причем плазмин генерируется не только на поверхности модели тромба, но и в его теле, с постепенным увеличением площади контакта фибринолитической протеазы со сгустком в результате его фрагментации [303].

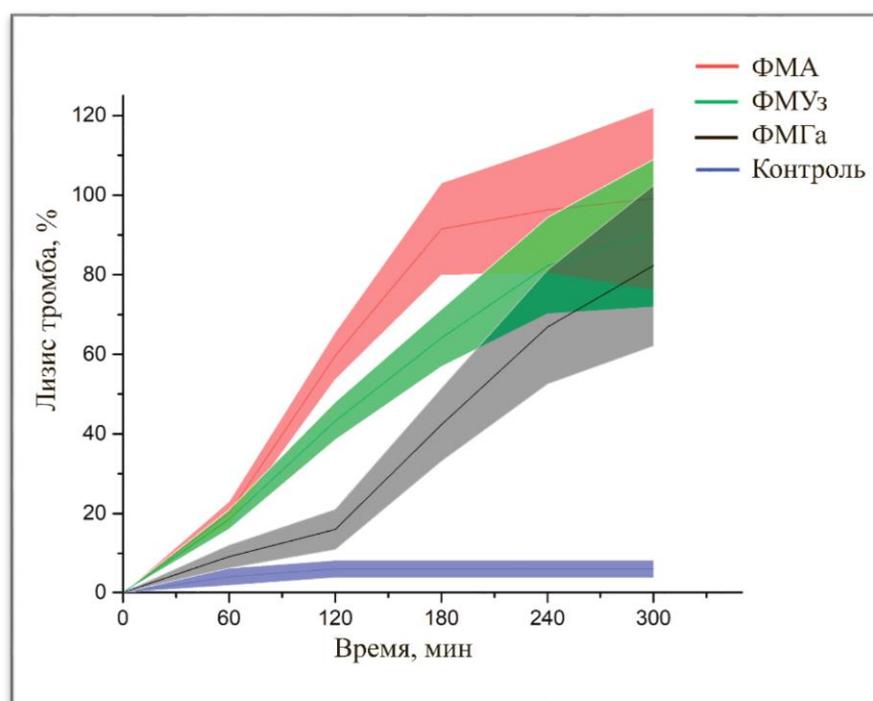


Рисунок 31 – Скорость лизиса фибринового сгустка в зависимости от вида носителя тромболитического агента

Затем фибринолитическая активность связанной и свободной формы тромболитического агента была исследована с помощью анализа лизиса

фибринового сгустка в плазме крови человека с использованием агарозных пластинок [233,234] с некоторыми изменениями. Форма пластинки позволяет рассмотреть процесс лизиса фибриновых сгустков лишь в 2D-плоскости под действием диффузионных процессов. Поэтому для определения фибринолитической активности иммобилизованного фермента при условии воздействия внешнего магнитного поля нами было предложено использовать иную форму – форму стержня.

Определение фибринолитической активности в плазме крови осуществлялось с целью выявления наличия защитных механизмов ТАП от дезактивации под действием ингибиторов в результате иммобилизации в наночастицы биокompозита на основе фукоидана. Как было отмечено выше, фукоидан обладает большей аффинностью и конкурентно связывается с ингибитором инактивации плазминогена (ИАП1) [15].

С помощью фибринового сгустка, сформированного в контрольной плазме крови и фиксированного в агарозном геле, было определено, могут ли полученные композиты под действием внешнего магнитного поля разрушать такие образования. Определение лизиса фибринового сгустка в плазме крови, фиксированного в агарозном геле, является больше качественным, а не количественным методом, поэтому исследование точности измерения не осуществлялось [212]. После инкубации в течение 8 ч при 37 °С фибриновый сгусток для свободного ТАП был лизирован полностью (рисунок не приведен).

Проникновение активатора плазминогена в фибриновый сгусток осуществляется в результате диффузионных процессов и конвекции [214]. При воздействии наночастиц биокompозита, содержащих ТАП, без использования магнитного наведения наблюдается отсутствие четкой границы раздела лизированный/нелизированный фибриновый сгусток. Возможно, что наночастицы биокompозита блокируют сайты, доступные для фибринолиза, а за счет увеличения кажущейся массы ТАП затрудняют и замедляют проникновение в тело сгустка. Однако внешнее воздействие позволяет ускорить эти процессы, и как результат наблюдается более явная граница раздела. Возможно, что в данных случаях

конвекция ТАП затруднена в связи со значительной адсорбцией иммобилизованного фермента на поверхности тромба, и, как следствие, происходит блокирование конвективного переноса во внутренние сайты сгустка с лизисом, осуществляемым через ряд локализованных реакций, протекаемых на поверхности фибринового сгустка.

При использовании магнитного наведения наблюдается более полный лизис фибриновых сгустков, частицы более глубоко проникли в пористую структуру фибрина, фиксированного в агарозном геле, причем граница раздела фаз агароза – фиксированные в структуре агарозы фибриновые сгустки более выражена, чем в системе без магнитного наведения (Рисунок 32).

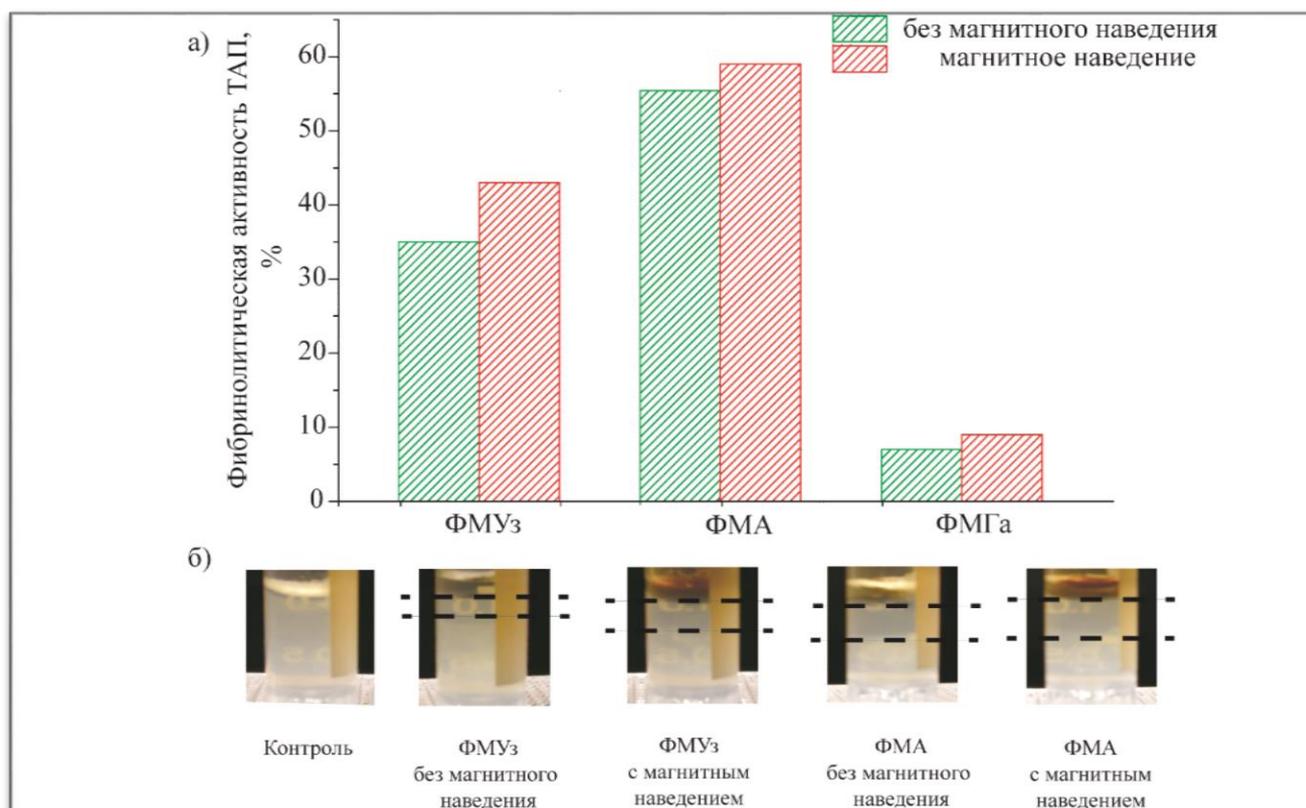


Рисунок 32 – Активность иммобилизованного ТАП, исследованная на фибриновых сгустках, фиксированных в агарозном геле

Снижение ферментативной активности (на примере амидолитической и фибринолитической активности) для связанного по сравнению со свободным

тромболитическим агентом осуществляется за счет частичного связывания активного центра или фермент-ферментного взаимодействия [232], для ковалентно иммобилизованного ТАП может быть обусловлено возможным участием в химической сшивке аминокислотных остатков фермента, отвечающих за распознавание субстрата [230].

Результаты анализа с использованием фибрин-агарозной матрицы показали, что лизис фибриновых сгустков, индуцированный ТАП, адсорбированный на носителе – нанобиокомпозите, был на 28 и 50 % (без магнитного наведения) и на 36 и 51 % (с магнитным наведением) эффективнее, чем индуцированный ковалентно иммобилизованным тромболитическим агентом (образец ФМГа). Это свидетельствует о более быстром высвобождении фермента, что подтверждается изменением кинетических кривых выпуска белка (см. выше). Кроме того, потеря активности ферментом при ковалентной иммобилизации согласуется с данными, представленными в работе У. Н. Ма с соавторами [222]. Таким образом, полученные системы обладали способностью к лизису фибриновых волокон и проникновению в агарозную матрицу, содержащую модели тромбов в виде фибриновых сгустков плазмы крови человека.

3.3.5. Исследование цитотоксичности нанобиокомпозитов *in vitro*

Целью данного этапа работы было определение биосовместимости, одной из характеристик которой является токсичность материала. Цитотоксичность определяли *in vitro* на основе МТТ-теста с помощью 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромидом на клеточной линии HeLa в зависимости от концентрации нанобиокомпозитов. Аликвоту дисперсии образцов нанобиокомпозитов вносили к клеточной линии с варьированием конечной концентрации от 1,531 до 24,5 мкг/мл с последующей оценкой их влияния на пролиферацию раковых клеток. В образце без содержания дополнительных компонентов (контроль) не наблюдалось изменения жизнеспособности клеток.

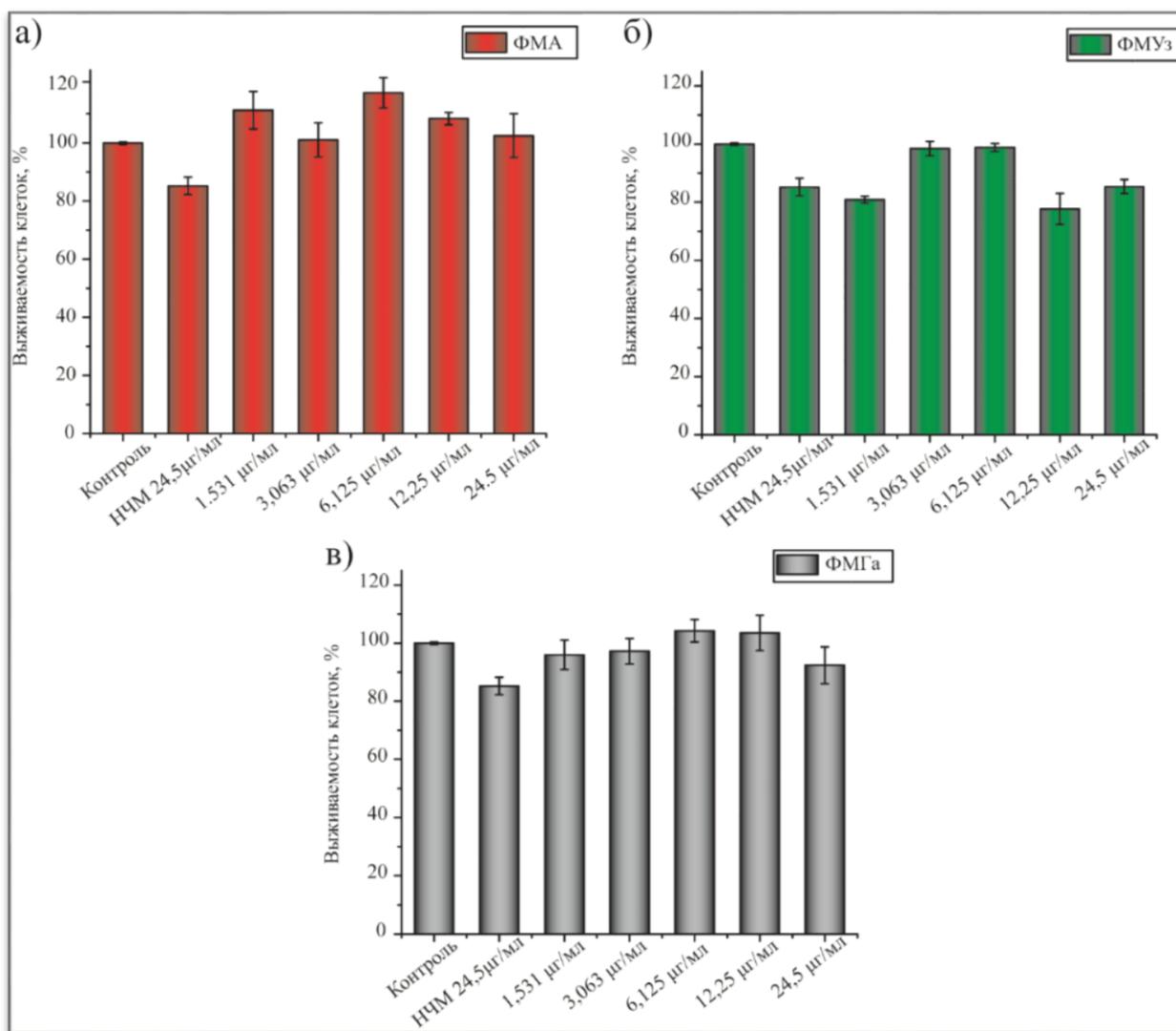


Рисунок 33 – Жизнеспособность клеток HeLa при использовании золя магнетита и варьировании концентрации (0; 1,531; 3,063; 6,125; 12,25; 24,5 µg/ml) и типа нанобиокомпозита при инкубации в течение 72 ч

Снижение жизнеспособности клеток HeLa после 3 суток инкубации для золя магнетита 24,5 µg/ml определено тем, что катионные носители с избыточным зарядом могут вызывать цитотоксичность, обусловленную взаимодействием с клеточной мембраной, несущей отрицательный заряд [217]. Выживаемость клеток превышала 77 % в присутствии всех концентраций образца ФМУз и 85 % для образцов ФМА, ФМГа (Рисунок 33). 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 при концентрации 6,125 $\mu\text{г}/\text{мл}$. В целом при применении всех типов нанобиокомпозитов наблюдается более высокая выживаемость клеток, чем при использовании золя магнетита той же концентрации. Таким образом, полученные нанобиокомпозиты типа ФМА обладают низкой цитотоксичностью, в том числе при использовании высоких концентраций. В то же время 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 фукоидана [304]. Однако полученная цитотоксичность в отношении раковых клеток имеет низкие значения в связи с тем, что используемый нами фукоидан обладает высокой степенью очистки. Так, в литературе предполагается, что существующее представление о высокой противоопухолевой активности в отношении некоторых раковых клеток может быть обусловлено наличием цитотоксических примесей, например полифенольных соединений [305].

Выводы

Эффективным препаратом для осуществления тромболиза в клинической практике является тканевой активатор плазминогена. С его помощью осуществляется фибринолиз путем активации профибринолизина с превращением его в фибринолизин.

Осуществление иммобилизации ТАП на сформированный нанобиокомпозит, содержащий фукоидан, функционализированных магнитными наночастицами, возможно путем ковалентного и нековалентного связывания. Такие нанобиокомпозиты применимы в качестве носителя тромболитического агента благодаря наличию функциональных групп, способствующих связыванию фермента, возможности связывания с ингибитором тромболитического агента и Р-селектином, обеспечивающим пассивный таргетинг, а наличие магнетита способствует активному нацеливанию при внешнем магнитном воздействии и обеспечивает суперпарамагнитное поведение полученных систем.

Исходя из способности к намагничиваемости, степени включения фермента и его фибринолитической активности лучшей матрицей для иммобилизации является ФМА. В целом иммобилизация тромболитического агента на полученных носителях позволяет повысить восприимчивость фибриновых сгустков к лизису благодаря доставке фермента непосредственно в сгусток. Магнито-чувствительные наноносители применимы для быстрой доставки тромболитического агента благодаря суперпарамагнетизму, что говорит об отсутствии остаточного магнетизма после удаления магнитного поля и высокой намагничиваемости образцов. Кроме того, такая целевая доставка ТАП с помощью внешнего магнитного поля и с высокой степенью иммобилизации фермента позволит значительно снизить риск геморрагических осложнений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в исследовании впервые разработан метод синтеза магнитоуправляемых биосовместимых нанокомпозитов на основе природного полимера – фукоидана. Ультразвуковая деградация фукоидана под действием высокоинтенсивного низкочастотного ультразвукового воздействия привела к значительному снижению размера макромолекул полисахарида, что позволяет рассматривать возможность применения такой обработки для получения наночастиц фукоидана (с минимальным средним гидродинамическим диаметром $85,9 \pm 32,9$ нм) быстрым и простым методом, осуществляемым в водном растворе без применения токсичных растворителей.

Размер частиц нанобиокомпозита может варьироваться в широком диапазоне в зависимости от условий ультразвуковой обработки нативного фукоидана. Такие композиты обладают высокой степенью загрузки, пролонгацией действия, способностью к намагничиванию (до $57,1 \pm 2,3$ кА/м) и применимы для иммобилизации лабильных соединений, в частности тромболитических ферментов, например тканевого активатора плазминогена, при создании инъекционных лекарственных форм. Способность к намагничиваемости является важной характеристикой системы активного таргетинга ТАП под действием внешнего магнитного поля. Высокие показатели значений намагничиваемости и суперпарамагнетизм способствуют наведению с помощью магнитного поля к месту тромба, а также возможности проникновения наночастиц композита в него. А благодаря суперпарамагнетизму после прекращения воздействия магнитным полем такие частицы не сохраняют остаточного магнетизма и выводятся из организма.

Разработанные магнито-управляемые нанобиокомпозиты с иммобилизированным тромболитическим агентом применимы для локальной доставки фермента в матрицу тромбиновых сгустков в просвете артерий и обладают высоким потенциалом применения для лечения острых тромбозов.

В работе получены следующие результаты:

– подобраны оптимальные условия получения частиц низкомолекулярного фукоидана методом ультразвуковой обработки с минимальным диаметром $38,4 \pm 5,4$ нм (СЭМ) / $85,92 \pm 32,9$ нм (ДРС) (40 мин, мощность 80 %);

– 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 (ПЭГ-400), где степень сульфатированности падает на 12,32 %. Так же установлен рост антиоксидантной активности в процессе увеличения времени и интенсивности воздействия, но с достоверным ее снижением относительно нативного фукоидана;

– установлен рост антиоксидантной активности в процессе увеличения времени и интенсивности воздействия (более высокая антиоксидантная активность отмечена при обработке фукоидана в течение 40 мин при интенсивности 200 Вт/см^2), однако наблюдается достоверное ее снижение относительно нативного фукоидана;

– 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 внутренний пути свертывания крови, а также рост активности обработанного полисахарида по сравнению с исходным фукоиданом (максимально в 2,4 раза для ПВ);

– разработан метод получения эффективной магнитоуправляемой таргетной системы доставки ферментативного препарата на основе деполимеризованного фукоидана, функционализированного наночастицами магнетита. Исследовано влияние функционализации фукоидана на электрокинетический потенциал, размер частиц, выход нанобиокомпозита. Повышение электрокинетического потенциала частиц с $-7,05 \pm 0,16$ до максимального $12,46 \pm 0,81$ мВ может свидетельствовать о

связывании полисахаридом магнетита с формированием системы с высоким содержанием магнетита (максимально $82,4 \pm 5,6$ % при исходном соотношении фукоидан:магнетит = 1:2,5). Совместная УЗ-обработка раствора нативного фукоидана и готовых наночастиц магнетита в течение 40 мин при интенсивности 133 Вт/см^2 позволила получить наночастицы с диаметром 55 ± 14 нм;

– предложен метод синтеза нанобиокомпозитов с иммобилизованным тромболитическим агентом на основе природного полимера, имеющих высокую степень загрузки и намагничиваемости, низкую степень полидисперстности. Изучена динамика высвобождения фермента с установлением срока пролонгации действия в течении 6 ч. Иммобилизация ТАП осуществлялась путем ковалентного и нековалентного взаимодействия. С увеличением концентрации фермента наблюдается рост частиц с высокой корреляцией «размер – концентрация фермента». Максимальное среднее значение гидродинамического диаметра ($369,7$ нм) наблюдается для частиц нанобиокомпозита с ковалентно иммобилизованным ТАП (ФМГа). Выявлены агрегационные процессы, при этом введение ПАВ позволяет снизить этот показатель при варьировании способа иммобилизации. Снижение дзета-потенциала может свидетельствовать об эффективной иммобилизации фермента;

– 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;

– доказано сохранение каталитической активности иммобилизованного тромболитического агента и высокая биосовместимость полученных препаратов при анализе на цитотоксичность с клетками HeLa.

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах

Патент:

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.

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК:

1. **Suprunchuk, V. E.** Low-molecular-weight fucoidan: Chemical modification, synthesis of its oligomeric fragments and mimetics / V. E. Suprunchuk // Carbohydrate Research. – 2019. – P. 107806.
2. **Suprunchuk, V. E.** Biocomposite containing fucoidan for drug delivery / V. E. Suprunchuk, E. V. Denisova, S. F. Andrusenko, E.A. Melchenko // Int. J. Biol. Biotech.– 2019. – Vol. 16. – № 3. – P. 623–625.
3. Denisova, E. V. Biopolymeric materials containing brown algae polysaccharides / E.V. Denisova, **V. E. Suprunchuk**, A. A. Dronova // Entomology and Applied Science Letters. – 2017. – Vol. 4. – № 2. – P. 19–23.
4. **Супрунчук, В. Е.** Фукоидан как компонент при разработке таргентных систем доставки лекарственных веществ / В. Е. Супрунчук, Е. В. Денисова // Молекулярная медицина. – 2019. – Т. 17. – № 5. – С. 23–30.
5. **Супрунчук, В. Е.** Оценка капсулирования и высвобождения белка из микрочастиц, содержащих фукоидан в условиях введения ПАВ / В. Е. Супрунчук, Е. В. Денисова, С. Ф. Андрусенко // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2018. – Т. 8. – № 3. – С. 92-98.
6. **Супрунчук, В. Е.,** Белок-полисахаридные микрокапсулы / В. Е. Супрунчук, Е. В. Денисова // Наука. Инновации. Технологии. – 2017. – № 2. – С. 199–206.

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

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

Статьи в сборниках трудов научных конференций

1) **Супрунчук, В. Е.** Разработка биополимерных микрокапсул на носителях различной природы / В. Е. Супрунчук, Е. В. Денисова // Сборник аннотаций XV Курчатовской междисциплинарной молодежной научной школы 14–17 ноября 2017 г. – Москва, 2017. – С. 125.

2) **Супрунчук, В.Е.** Противомикробная активность микрокапсул, содержащих фукоидан// В. Е. Супрунчук, З.Э. Байрамукова / Биоразнообразие, биоресурсы, вопросы химии, биотехнологии и здоровье населения Северо-Кавказского региона: материалы V (62-й) ежегодной научно-практической конференции «Университетская наука – региону» Северо-Кавказского федерального университета (3–21 апреля 2017 года). – Ставрополь : Изд-во СКФУ, 2017. – 387 с.

3) **Супрунчук, В. Е.** Получение микрочастиц фукоиданов // Молодежь и наука : сборник материалов IX Всероссийской научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием / отв. ред. О. А. Краев [Электронный ресурс]. – Красноярск : Сиб. федер. ун-т, 2013. – Режим доступа: <http://conf.sfu-kras.ru/sites/mn2013/>

4) **Супрунчук, В.Е.** Микрочастицы на основе фукоидана и его производных / Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2013» / Отв. ред. А. И. Андреев, А. В. Андриянов, Е. А. Антипов,

М. В. Чистякова. [Электронный ресурс]. – М.: МАКС Пресс, 2013. – Режим доступа:

http://www.msu.ru/ad/mezhdunarodnyy_molodezhnyy_nauchnyy_forum_lomonosov_2013.html

5) **Супрунчук, В.Е.** Полисахариды как антиоксиданты/ Андрусенко С.Ф., Денисова Е.В./ Биоразнообразие, биоресурсы, новые материалы и здоровье населения региона: Материалы 56-й научно-методической конференции преподавателей и студентов «Университетская наука – региону», 7–30 апреля 2011 г. – Ставрополь: Изд-во СГУ, 2011. – 233 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АА	– акриламид
АЧТВ	– активированное частичное тромбопластиновое время
БСА	– бычий сывороточный альбумин
ДРС	– динамическое рассеяние света
ДСН	– додецилсульфат натрия
ИАП1	– ингибитор активации плазминогена
ЛВ	– лекарственное вещество
МНЧ	– магнитные наночастицы
ПАВ	– поверхностно-активное вещество
ПВ	– протромбиновое время
ПСА	– персульфат аммония
ПЭГ	– полиэтиленгликоль
РЭМ	– растровая электронная микроскопия
СВ	– степень включения
СЭМ	– сканирующая электронная микроскопия
ТАП	– тканевой активатор плазминогена
ТЕМЕД	– тетраметилэтилендиамин
ТВ	– тромбиновое время
УЗ	– ультразвук
ФСБ	– фосфатно-солевой буфер
ФМА	– образец бионанокompозита, полученный при смешивании частиц деполмеризованного фукоидана с золемагнетита в соотношении 2,5:1 с адсорбированным ТАП

ФМГа	– образец бионанокompозита с ковалентно иммобилизированным ТАП с помощью глутарового альдегида
ФМУз	– образец бионанокompозита, полученный после ультразвуковой обработки исходного фукоидана в присутствии МНЧ с последующей иммобилизацией ТАП
ЭВ	– эффективность вовлечения
bFGF	– основной фактор роста фибробластов
DPPE	– 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин
DSPE-PEG 2000	– дистеаролифосфатидилэтаноламин-N-поли(этиленгликоль) 2000
EDC	– 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид
GRGD пептид	– пептид вида Gly-Arg-Gly-Asp
HeLa клетки	– клеточная линия карциномы шейки матки
NHS	– N-гидроксисукцинимид
PLGA	– поли(молочной-со-глицолевая кислота)
pNa	– пара-нитроанилин
PSGL-1	– гликопротеиновый лиганд Р-селектина 1
sulfo-NHS	N-гидроксисульфосукцинимид
TGF-β	трансформирующий фактор роста-β

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Талгатов Э.Т. Синтез, характеристика, каталитические и детоксикационные свойства полисахарид-неорганических композитов: дис. ... докт. фил. наук. Алматы, 2016. 131 с.
2. Elbially N.S., Fathy M.M., Khalil W.M. Doxorubicin loaded magnetic gold nanoparticles for in vivo targeted drug delivery // *Int. J. Pharm. Elsevier B.V.*, 2015. Vol. 490, № 1–2. P. 190–199.
3. Oberti S., Neilda A., Möller D., Dual J. Strategies for single particle manipulation using acoustic radiation forces and external tools // *Phys. Procedia. Elsevier*, 2010. Vol. 3, № 1. P. 255–262.
4. Schaefer D.J., Bourland J.D., Nyenhuis J.A. Review of patient safety in time-varying gradient fields // *J. Magn. Reson. Imaging*. 2000. Vol. 12, № 1. P. 20–29.
5. Chandur V.K., Badiger A.M., Rao K.R.S.S. Characterizing formulations containing derivatized chitosan with polymer blending // *Int J Res Pharm Chem*. 2011. Vol. 4, № 1. P. 950–967.
6. 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.
7. Same S., Aghanejad A., Nakhjavani S.A., Barar J., Omid Y. Radiolabeled theranostics: magnetic and gold nanoparticles // *BioImpacts*. 2016. Vol. 6, № 3. P. 169–181.
8. 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.
9. Mandal Goswami M. Synthesis of micelles guided magnetite (Fe₃O₄) hollow spheres and their application for AC magnetic field responsive drug release // *Sci. Rep. Nature Publishing Group*, 2016. Vol. 6, № 1. P. 1–10.
10. Berry C.C., Curtis A.S.G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for

- applications in biomedicine // *J. Phys. D. Appl. Phys.* 2003. Vol. 36, № 13. P. R198–R206.
11. Abdollah M.R.A., Carter T.J., Jones C., Kalber T.L., Rajkumar V., Tolner B., Gruettner C., Zaw-Thin M., Torres J.B., Matthew Ellis, Mathew Robson, R. Barbara Pedley, Paul Mulholland, Rafael T. M. de R and K.A.C. Fucoidan Prolongs the Circulation Time of Dextran-Coated Iron Oxide Nanoparticles // *ACS Nano*. 2018. Vol. 12, № 2. P. 1156–1169.
 12. Min S.K., Han S.M., Kim H.T., Kwon O.C., Lee S., Kim J.K. Algal fucoidan, unlike heparin, has thrombolytic activity in a murine arterial thrombosis model // *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 2012. Vol. 23, № 5. P. 359–366.
 13. Lang D.S., Williams T., Phillips A., Doctor V.M. Mechanism of the stimulatory effect of native fucoidan, highly sulfated fucoidan and heparin on plasminogen activation by tissue plasminogen activator: The role of chloride // *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 2004. Vol. 29, № 4. P. 95–109.
 14. Soeda S., Sakaguchi S., Shimeno H., Nagamatsu A. Fibrinolytic and anticoagulant activities of highly sulfated fucoidan // *Biochem. Pharmacol.* Elsevier, 1992. Vol. 43, № 8. P. 1853–1858.
 15. Choi Y., Min S.K., Usoltseva R., Silchenko A., Zvyagintseva T., Ermakova S., Kim J.K. Thrombolytic fucoidans inhibit the tPA-PAI1 complex, indicating activation of plasma tissue-type plasminogen activator is a mechanism of fucoidan-mediated thrombolysis in a mouse thrombosis model // *Thromb. Res.* 2018. Vol. 161. P. 22–25.
 16. Nishino T., Yamauchi T., Horie M., Nagumo T., Suzuki H. Effects of a fucoidan on the activation of plasminogen by u-PA and t-PA // *Thromb. Res.* Pergamon, 2000. Vol. 99, № 6. P. 623–634.
 17. 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.
 18. Bachelet-Violette L., Silva A.K.A., Maire M., Michel A., Brinza O., Ou P., Ollivier

- V., Nicoletti A., Wilhelm C., Letourneur D., Ménager C., Chaubet F. Strong and specific interaction of ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles and human activated platelets mediated by fucoidan coating // *RSC Adv.* 2014. Vol. 4, № 10. P. 4864.
19. François R., Bachelet-Violette, Laure Alsac J.-M., Suzuki M., Meulemans A., Louedec L., Petiet A., Jandrot-perrus M., Guludec D. Le, Letourneur D. Radiolabeled fucoidan as a P-selectin targeting agent for in vivo imaging of platelet-rich thrombus and endothelial activation // *J. Nucl. Med.* 2011. Vol. 52, № 9. P. 1433–1440.
 20. Kloareg B., Demarty M., Mabeau S. Polyanionic characteristics of purified sulphated homofucans from brown algae // *Int. J. Biol. Macromol.* 1986. Vol. 8, № 6. P. 380-386.
 21. Cong Q., Chen H., Liao W., Xiao F., Wang P., Qin Y., Dong Q., Ding K. Structural characterization and effect on anti-angiogenic activity of a fucoidan from *Sargassum fusiforme* // *Carbohydr. Polym.* 2016. Vol. 136. P. 899–907.
 22. Ale M.T., Maruyama H., Tamauchi H., Mikkelsen J.D., Meyer A.S. Fucoidan from *Sargassum* sp. and *Fucus vesiculosus* reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells in vitro and activates natural killer cells in mice in vivo // *Int. J. Biol. Macromol.* 2011. Vol. 49, № 3. P. 331–336.
 23. Vinnitskiy D.Z., Krylov V.B., Ustyuzhanina N.E., Dmitrenok A.S., Nifantiev N.E. The synthesis of heterosaccharides related to the fucoidan from *Chordaria flagelliformis* bearing an α -L-fucofuranosyl unit // *Org. Biomol. Chem. Royal Society of Chemistry*, 2016. Vol. 14, № 2. P. 598–611.
 24. Khatuntseva E.A., Ustuzhanina N.E., Zatonskii G. V., Shashkov A.S., Usov A.I., Nifant'ev N.E. Synthesis, NMR and conformational studies of fucoidan fragments 1: 1 desulfated 2,3- and 3,4-branched trisaccharide fragments and constituting disaccharides // *J. Carbohydr. Chem.* 2000. Vol. 19, № 9. P. 1151–1173.
 25. Cumashi A., Ushakova N.A., Preobrazhenskaya M.E., D'Incecco A., Piccoli A., Totani L., Tinari N., Morozevich G.E., Berman A.E., Bilan M.I., Usov A.I., Ustyuzhanina N.E., Grachev A.A., Sanderson C.J., Kelly M., Rabinovich G.A.,

- Iacobelli S., Nifantiev N.E. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds // *Glycobiology*. 2007. Vol. 17, № 5. P. 541–552.
26. Holtkamp A.D., Kelly S., Ulber R., Lang S. Fucoidans and fucoidanases-focus on techniques for molecular structure elucidation and modification of marine polysaccharides // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009. Vol. 82, № 1. P. 1–11.
27. Mak W., Wang S.K., Liu T., Hamid N., Li Y., Lu J., White W.L. Anti-proliferation potential and content of fucoidan extracted from sporophyll of New Zealand *Undaria pinnatifida* // *Front. Nutr.* 2014. Vol. 1. P. 1–10.
28. Chollet L., Saboural P., Chauvierre C., Villemin J.N., Letourneur D., Chaubet F., Laurienzo P. Fucoidans in nanomedicine // *Mar. Drugs*. 2016. Vol. 14, № 8. P. 145:(1-24).
29. Kylin H. Zur Biochemie der Meeresalgen // *Zeitschrift für Physiol. Chemie*. 1913. Vol. 83. P. 171–197.
30. Silva T.H., Alves A., Popa E.G., Reys L.L., Gomes M.E., Sousa R.A., Silva S.S., Mano J.F., Reis R.L. Marine algae sulfated polysaccharides for tissue engineering and drug delivery approaches // *Biomatter*. 2012. Vol. 2, № 4. P. 278–289.
31. Larsen, B.; Haug, A.; Painter T.J. Sulphated polysaccharides in brown algae // *Acta chem. scand.* 1966. Vol. 20. P. 219–230.
32. Deniaud-Bouët E., Kervarec N., Michel G., Tonon T., Kloareg B., Hervé C. Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from Fucales: Insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae // *Ann. Bot.* 2014. Vol. 114. P. 1203–1216.
33. Berteau O., Mulloy B. Sulfated fucans, fresh perspectives: Structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide // *Glycobiology*. 2003. Vol. 13, № 6. P. 29R-40R.
34. Vilela-Silva A.C.E.S., Castro M.O., Valente A.P., Biermann C.H., Mourão P.A.S. Sulfated fucans from the egg jellies of the closely related sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis* and *Strongylocentrotus pallidus* ensure species-

- specific fertilization // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 271, № 1. P. 379–387.
35. Ribeiro A.C., Vieira R.P., Mourão P.A.S., Mulloy B. A sulfated α -1-fucan from sea cucumber // *Carbohydr. Res.* 1994. Vol. 255. P. 225–240.
 36. Дрозд Н.Н., Банникова Г.Е., Макаров В.А., Варламов В.П. Антикоагулянтная активность сульфатированных полисахаридов // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2006. Vol. 69, № 6. P. 51–62.
 37. Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag. // *Carbohydr. Res. Elsevier*, 2002. Vol. 337, № 8. P. 719–730.
 38. Li B., Lu F., Wei X., Zhao R. Fucoidan: Structure and bioactivity // *Molecules.* 2008. Vol. 13, № 8. P. 1671–1695.
 39. Chevlot L., Mulloy B., Ratiskol J., Foucault A., Collic-Jouault S. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae // *Carbohydr. Res. Elsevier*, 2001. Vol. 330, № 4. P. 529–535.
 40. Tsai H.-L., Tai C.-J., Huang C.-W., Chang F.-R., Wang J.-Y. Efficacy of low-molecular-weight fucoidan as a supplemental therapy in metastatic colorectal cancer patients: a double-blind randomized controlled trial // *Mar. Drugs.* 2017. Vol. 15, № 4. P. 122-1-122–124.
 41. Jiao G., Yu G., Zhang J., Ewart H.S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae // *Mar. Drugs.* 2011. Vol. 9, № 2. P. 196–223.
 42. Ghosh P., Adhikari U., Ghosal P.K., Pujol C.A., Carlucci M.J., Damonte E.B., Ray B. In vitro anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa* // *Phytochemistry. Pergamon*, 2004. Vol. 65, № 23. P. 3151–3157.
 43. Lee J.-B., Koizumi S., Hayashi K., Hayashi T. Structure of rhamnan sulfate from the green alga *Monostroma nitidum* and its anti-herpetic effect // *Carbohydr. Polym. Elsevier*, 2010. Vol. 81, № 3. P. 572–577.
 44. Shevchenko N.M., Anastyuk S.D., Menshova R. V., Vishchuk O.S., Isakov V.I., Zadorozhny P.A., Sikorskaya T. V., Zvyagintseva T.N. Further studies on structure of fucoidan from brown alga *Saccharina gurjanovae* // *Carbohydr. Polym. Elsevier*,

2015. Vol. 121. P. 207–216.
45. Yu L., Ge L., Xue C., Chang Y., Zhang C., Xu X., Wang Y. Structural study of fucoidan from sea cucumber *Acaudina molpadioides*: A fucoidan containing novel tetrafucose repeating unit // *Food Chem. Elsevier*, 2014. Vol. 142. P. 197–200.
 46. Yu L., Xue C., Chang Y., Hu Y., Xu X., Ge L., Liu G. Structure and rheological characteristics of fucoidan from sea cucumber *Apostichopus japonicus* // *Food Chem. Elsevier*, 2015. Vol. 180. P. 71–76.
 47. Thanh T.T.T., Tran V.T.T., Yuguchi Y., Bui L.M., Nguyen T.T. Structure of fucoidan from brown seaweed *turbinaria ornata* as studied by electrospray ionization mass spectrometry (ESIMS) and small angle x-ray scattering (SAXS) techniques // *Mar. Drugs*. 2013. Vol. 11, № 7. P. 2431-2443.
 48. Cuong H.D., Thuy T.T.T., Huong T.T., Ly B.M., Van T.T.T. Structure and hypolipidaemic activity of fucoidan extracted from brown seaweed *Sargassum henslowianum* // *Nat. Prod. Res.* 2015. Vol. 29, № 5. P. 411–415.
 49. Anastyuk S. D., Shevchenko N. M., Gorbach V. I. Fucoidan analysis by tandem maldi-tof and esi mass spectrometry // *Natural Products From Marine Algae*. New York: Humana Press, 2015. P. 299–312.
 50. Zayed A., Ulber R. Fucoidan production: approval key challenges and opportunities // *Carbohydr. Polym. Elsevier Ltd.*, 2019. P. 289–297.
 51. Chi S., Liu T., Wang X., Wang R., Wang S., Wang G., Shan G., Liu C. Functional genomics analysis reveals the biosynthesis pathways of important cellular components (alginate and fucoidan) of *Saccharina* // *Curr. Genet. Springer Berlin Heidelberg*, 2018. Vol. 64, № 1. P. 259–273.
 52. Michel G., Tonon T., Scornet D., Cock J.M., Kloareg B. The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* . Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes // *New Phytol.* 2010. Vol. 188. P. 82–97.
 53. Li S., Li J., Zhi Z., Wei C., Wang W., Ding T., Ye X., Hu Y., Linhardt R.J., Chen S. Macromolecular properties and hypolipidemic effects of four sulfated polysaccharides from sea cucumbers // *Carbohydr. Polym. Elsevier*, 2017. Vol. 173.

- P. 330–337.
54. Andrade L.R., Salgado L.T., Farina M., Pereira M.S., Mourão P.A.S., Amado Filho G.M. Ultrastructure of acidic polysaccharides from the cell walls of brown algae // *J. Struct. Biol. Academic Press*, 2004. Vol. 145, № 3. P. 216–225.
 55. Xu X., Xue C., Chang Y., Liu G. Chain conformation, rheological and charge properties of fucoidan extracted from sea cucumber *Thelenota ananas*: A semi-flexible coil negative polyelectrolyte // *Food Chem. Elsevier*, 2017. Vol. 237. P. 511–515.
 56. Wei X., Cai L., Liu H., Tu H., Xu X., Zhou F., Zhang L. Chain conformation and biological activities of hyperbranched fucoidan derived from brown algae and its desulfated derivative // *Carbohydr. Polym. Elsevier Ltd.*, 2018. Vol. 208. P. 86–96.
 57. Zhao X., Guo F., Hu J., Zhang L., Xue C., Zhang Z., Li B. Antithrombotic activity of oral administered low molecular weight fucoidan from *Laminaria Japonica* // *Thromb. Res.* 2016. Vol. 144. P. 46–52.
 58. Hwang P.A., Hung Y.L., Chien S.Y. Inhibitory activity of *Sargassum hemiphyllum* sulfated polysaccharide in arachidonic acid-induced animal models of inflammation // *J. Food Drug Anal.* 2015. Vol. 23, № 1. P. 49–56.
 59. Wang J., Zhang Q., Zhang Z., Song H., Li P. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2010. Vol. 46. P. 6–12.
 60. Irhimeh M.R., Fitton J.H., Lowenthal R.M. Pilot clinical study to evaluate the anticoagulant activity of fucoidan // *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 2009. Vol. 20, № 7. P. 607–610.
 61. Aguilar-Briseno J.A., Cruz-Suarez L.E., Sassi J.F., Ricque-Marie D., Zapata-Benavides P., Mendoza-Gamboa E., Rodriguez-Padilla C., Trejo-Avila L.M. Sulphated polysaccharides from *Ulva clathrata* and *Cladosiphon okamuranus* seaweeds both inhibit viral attachment/entry and cell-cell fusion, in NDV infection // *Mar. Drugs.* 2015. Vol. 13, № 2. P. 697–712.
 62. Ruocco N., Costantini S., Guariniello S., Costantini M. Polysaccharides from the marine environment with pharmacological, cosmeceutical and nutraceutical

- potential // *Molecules*. 2016. Vol. 21, № 5. P. 1–16.
63. Yue Y., Li Z., Li P., Song N., Li B., Lin W., Liu S. Antiviral activity of a polysaccharide from *Laminaria japonica* against enterovirus 71 // *Biomed. Pharmacother.* Elsevier, 2017. Vol. 96. P. 256–262.
 64. Wijesekara I., Pangestuti R., Kim S.K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae // *Carbohydr. Polym.* 2011. Vol. 84, № 1. P. 14–21.
 65. Hsu H.-Y., Lin T.-Y., Wu Y.-C., Tsao S.-M., Hwang P.-A., Shih Y.-W., Hsu J. Fucoidan inhibition of lung cancer in vivo and in vitro: role of the Smurf2-dependent ubiquitin proteasome pathway in TGF β receptor degradation // *Oncotarget*. 2014. Vol. 5, № 17. P. 7870–7885.
 66. Rui X., Pan H.-F., Shao S.-L., Xu X.-M. Anti-tumor and anti-angiogenic effects of fucoidan of prostate cancer: possible JAK-STAT3 pathway // *BMC Complement. Altern. Med.* 2017. Vol. 17, № 1. P. 378–386.
 67. Pereira M.S., Mulloy B., Mourão P.A.S. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. Comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 12. P. 7656–7667.
 68. Li C., Gao Y., Xing Y., Zhu H., Shen J., Tian J. Fucoidan, a sulfated polysaccharide from brown algae, against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats via regulating the inflammation response // *Food Chem. Toxicol.* 2011. Vol. 49. P. 2090–2095.
 69. Ikeguchi M., Yamamoto M., Arai Y., Maeta Y., Ashida K., Katano K., Miki Y., Kimura T. Fucoidan reduces the toxicities of chemotherapy for patients with unresectable advanced or recurrent colorectal cancer // *Oncol. Lett.* 2011. Vol. 2. № 2. P. 319–322.
 70. Xing R., Liu S., Yu H., Chen X., Qin Y., Li K., Li P. Extraction and separation of fucoidan from *Laminaria japonica* with chitosan as extractant // *Biomed Res. Int.* 2013. Vol. 2013.
 71. Nan C., Yijie M., Yinhu X. Protective role of fucoidan in cerebral ischemia-

- reperfusion injury through inhibition of MAPK signaling pathway // *Biomol. Ther.* (Seoul). 2017. Vol. 25, № 3. P. 272–278.
72. Vetvicka V., Vetvickova J. Fucoidans stimulate immune reaction and suppress cancer growth // *Anticancer Res.* 2017. Vol. 37, № 11. P. 6041–6046.
73. Kim M.-H., Joo H.-G. Immunostimulatory effects of fucoidan on bone marrow-derived dendritic cells // *Immunol. Lett. Elsevier*, 2008. Vol. 115, № 2. P. 138–143.
74. Dorrington M.G., Bowdish D.M.E. Immunosenescence and novel vaccination strategies for the elderly // *Front. Immunol.* 2013. Vol. 4. P. 171:1-9.
75. Kim S.Y., Joo H.G. Evaluation of adjuvant effects of fucoidan for improving vaccine efficacy // *J. Vet. Sci.* 2015. Vol. 16, № 2. P. 145–150.
76. Besednova N.N., Persiyanova E.V., Ermakova S.P., Kuznetsova T.A., Ivanushko L.A., Khotimchenko M.Y., Shutikova A.L. Evaluation of adjuvant effects of fucoidane from brown seaweed *Fucus evanescens* and its structural analogues for the strengthening vaccines effectiveness // *Biomeditsinskaya Khimiya. Institute of biomedical chemistry, Moscow, Russia*, 2017. Vol. 63, № 6. P. 553–558.
77. Saito A., Yoneda M., Yokohama S., Okada M., Haneda M., Nakamura K. Fucoidan prevents concanavalin A-induced liver injury through induction of endogenous IL-10 in mice // *Hepatol. Res.* No longer published by Elsevier, 2006. Vol. 35, № 3. P. 190–198.
78. Lee S.H., Ko C.I., Jee Y., Jeong Y., Kim M., Kim J.S., Jeon Y.J. Anti-inflammatory effect of fucoidan extracted from *Ecklonia cava* in zebrafish model // *Carbohydr. Polym.* 2013. Vol. 92, № 1. P. 84–89.
79. O’Leary R., Rerek M., Wood E.J. Fucoidan modulates the effect of transforming growth factor (TGF)- β 1 on fibroblast proliferation and wound repopulation in in vitro models of dermal wound repair // *Biol. Pharm. Bull.* 2004. Vol. 27, № 2. P. 266–270.
80. Sezer A. D., Cevher E. Biopolymers as wound healing materials: challenges and new strategies // *Biomaterials Applications for Nanomedicine. InTech*, 2011. Vol. Chapter 19. P. 383–414.
81. Хотимченко Ю.С. Углеводные биополимеры для адресной доставки белковых

- препаратов, нуклеиновых кислот и полисахаридов // Тихоокеанский медицинский журнал. 2014. Вып. 56, № 2. С. 5–13.
82. Yanagibayashi S., Kishimoto S., Ishihara M., Murakami K., Aoki H., Takikawa M., Fujita M., Sekido M., Kiyosawa T. Novel hydrocolloid-sheet as wound dressing to stimulate healing-impaired wound healing in diabetic db/db mice // *Biomed. Mater. Eng.* 2012. Vol. 22. P. 301–310.
83. Sezer A.D., Cevher E., Hatipoğlu F., Oğurtan Z., Baş A.L., Akbuğa J. The use of fucosphere in the treatment of dermal burns in rabbits // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008. Vol. 69, № 1. P. 189–198.
84. Bachelet L., Bertholon I., Lavigne D., Vassy R., Jandrot-Perrus M., Chaubet F., Letourneur D. Affinity of low molecular weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* Elsevier, 2009. Vol. 1790, № 2. P. 141–146.
85. Shamay Y., Elkabets M., Li H., Shah J., Brook S., Wang F., Adler K., Baut E., Scaltriti M., Jena P. V., Gardner E.E., Poirier J.T., Rudin C.M., Baselga J., Haimovitz-Friedman A., Heller D.A. P-selectin is a nanotherapeutic delivery target in the tumor microenvironment // *Sci. Transl. Med.* 2016. Vol. 8, № 345. P. 345ra87-345ra87.
86. Ghebouli R., Loyau S., Maire M., Saboural P., Collet J.-P., Jandrot-Perrus M., Letourneur D., Chaubet F., Michel J.-B. Amino-fucoidan as a vector for rtPA-induced fibrinolysis in experimental thrombotic events // *Thromb Haemost.* 2018. Vol. 118. P. 42–53.
87. Atashrazm F., Lowenthal R.M., Woods G.M., Holloway A.F., Dickinson J.L. Fucoidan and cancer: A multifunctional molecule with anti-tumor potential // *Mar. Drugs.* 2015. Vol. 13. P. 2327–2346.
88. Roza V. U., Stanislav D. A., Irina A. I., Vladimir V. I., Tatiana N., Zvyagintseva, Pham Duc T., Pavel A. Z., Pavel S. D., Svetlana P. E. Structural characteristics and anticancer activity in vitro of fucoidan from brown algae *Padina boryana* // *Carbohydr. Polym.* Elsevier Ltd., 2018. Vol. 184. P. 260–268.
89. Morya V.K., Kim J., Kim E.K. Algal fucoidan: Structural and size-dependent

- bioactivities and their perspectives // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012. Vol. 93, № 1. P. 71–82.
90. Hwang P.-A., Hung Y.-L., Phan N.N., Hieu B.-T.-N., Chang P.-M., Li K.-L., Lin Y.-C. The in vitro and in vivo effects of the low molecular weight fucoidan on the bone osteogenic differentiation properties // *Cytotechnology.* 2016. Vol. 68, № 4. P. 1349–1359.
91. Ferial H.-B., Mostafa E., Corinne S., Boisson-Vidal C. Relationship between sulfate groups and biological activities of fucans // *J. Chem. Res. - Part S.* 2000. Vol. 100, № 5. P. 453–459.
92. Nishino T., Nagumo T. Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans // *Carbohydr. Res. Elsevier*, 1992. Vol. 229, № 2. P. 355–362.
93. Jin W., Zhang Q., Wang J., Zhang W. A comparative study of the anticoagulant activities of eleven fucoidans // *Carbohydr. Polym. Elsevier*, 2013. Vol. 91, № 1. P. 1–6.
94. Zuo T., Li X., Chang Y., Duan G., Yu L., Zheng R., Xue C., Tang Q. Dietary fucoidan of *Acaudina molpadioides* and its enzymatically degraded fragments could prevent intestinal mucositis induced by chemotherapy in mice // *Food Funct.* 2015. Vol. 6, № 2. P. 415–422.
95. Kim K.-T., Rioux L.-E., Turgeon S.L. Molecular weight and sulfate content modulate the inhibition of α -amylase by fucoidan relevant for type 2 diabetes management // *PharmaNutrition. Elsevier*, 2015. Vol. 3, № 3. P. 108–114.
96. Rasin A.B., Ermakova S.P. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from brown alga *Fucus evanescens*. Structure and biological activity of the new fucoidan fractions . // *J. Appl. Phycol. Journal of Applied Phycology*, 2018. Vol. 30, № 3. P. 2039–2046.
97. Khil'chenko S.R., Zaporozhets T.S., Shevchenko N.M., Zvyagintseva T.N., Vogel U., Seeberger P., Lepenies B. Immunostimulatory activity of fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens*: Role of sulfates and acetates // *J. Carbohydr. Chem.* 2011. Vol. 30, № 4–6. P. 291–305.
98. Thuy T.T.T., Ly B.M., Van T.T.T., Van Quang N., Tu H.C., Zheng Y., Seguin-

- Devaux C., Mi B., Ai U. Anti-HIV activity of fucoidans from three brown seaweed species // *Carbohydr. Polym. Elsevier*, 2015. Vol. 115. P. 122–128.
99. Rabanal M., Ponce N.M.A., Navarro D.A., Gómez R.M., Stortz C.A. The system of fucoidans from the brown seaweed *Dictyota dichotoma*: chemical analysis and antiviral activity // *Carbohydr. Polym. Elsevier*, 2014. Vol. 101. P. 804–811.
100. Elizondo-Gonzalez R., Cruz-Suarez L.E., Ricque-Marie D., Mendoza-Gamboa E., Rodriguez-Padilla C., Trejo-Avila L.M. In vitro characterization of the antiviral activity of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* against Newcastle Disease Virus // *Virol. J.* 2012. Vol. 9, № 1. P. 307 (1-9).
101. Schneider T., Ehrig K., Liewert I., Alban S. Interference with the CXCL12/CXCR4 axis as potential antitumor strategy: Superiority of a sulfated galactofucan from the brown alga *Saccharina latissima* and fucoidan over heparins // *Glycobiology*. 2015. Vol. 25, № 8. P. 812–824.
102. Урванцева А.М., Бакунина И.Ю., Ким Н.Ю., Исаков В.В., Глазунов В.П., Звягинцева Т.Н. Выделение очищенного фукоидана из природного комплекса с полифенолами и его характеристика // *Химия растительного сырья*. 2004. № 3. P. 15–24.
103. Yuan Y., Macquarrie D. Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from *Ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity // *Carbohydr. Polym. Elsevier*, 2015. Vol. 129. P. 101–107.
104. Macquarrie D. J., Clark J. H., Fitzpatrick E. The microwave pyrolysis of biomass // *Biofuels, Bioprod. Biorefining*. 2012. Vol. 6, № 5. P. 549–560.
105. Fan J., De Bruyn M., Budarin V.L., Gronnow M.J., Shuttleworth P.S., Breeden S., Macquarrie D.J., Clark J.H. Direct microwave-assisted hydrothermal depolymerization of cellulose // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. Vol. 135, № 32. P. 11728–11731.
106. Bagherian H., Zokaee Ashtiani F., Fouladitajar A., Mohtashamy M. Comparisons between conventional, microwave- and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit // *Chem. Eng. Process. Process Intensif. Elsevier*, 2011. Vol. 50, № 11–12. P. 1237–1243.

107. Xu Y., Zhang L., Bailina Y., Ge Z., Ding T., Ye X., Liu D. Effects of ultrasound and/or heating on the extraction of pectin from grapefruit peel // *J. Food Eng. Elsevier*, 2014. Vol. 126. P. 72–81.
108. Vázquez-Delfín E., Robledo D., Freile-Pelegrín Y. Microwave-assisted extraction of the Carrageenan from *Hypnea musciformis* (Cystocloniaceae, Rhodophyta) // *J. Appl. Phycol.* 2014. Vol. 26, № 2. P. 901–907.
109. Rodriguez-Jasso R.M., Mussatto S.I., Pastrana L., Aguilar C.N., Teixeira J.A. Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed // *Carbohydr. Polym. Elsevier*, 2011. Vol. 86, № 3. P. 1137–1144.
110. Yuan Y., Macquarrie D.J. Microwave assisted step-by-step process for the production of fucoidan, alginate sodium, sugars and biochar from *Ascophyllum nodosum* through a biorefinery concept // *Bioresour. Technol. Elsevier*, 2015. Vol. 198. P. 819–827.
111. Flórez-fernández N., López-garcía M., González-muñoz M.J. Ultrasound-assisted extraction of fucoidan from *Sargassum muticum* // *J. Appl. Phycol. Journal of Applied Phycology*, 2017. Vol. 29. P. 1553–1561.
112. Baba B.M., Mustapha W.A.W., Joe L.S. Effects of extraction solvent on fucose content in fucoidan extracted from brown seaweed (*Sargassum* sp.) from Pulau Langkawi, Kedah, Malaysia // *AIP Conference Proceedings. AIP Publishing*, 2016. P. 030045-1-030045–5.
113. Fitton J.H., Stringer D.N., Karpiniec S.S. Therapies from fucoidan: An update // *Mar. Drugs*. 2015. Vol. 13, № 9. P. 5920–5946.
114. Bruhn A., Janicek T., Manns D., Nielsen M.M., Balsby T.J.S., Meyer A.S., Rasmussen M.B., Hou X., Saake B., Göke C., Bjerre A.B. Crude fucoidan content in two North Atlantic kelp species, *Saccharina latissima* and *Laminaria digitata*—seasonal variation and impact of environmental factors // *J. Appl. Phycol.* 2017. Vol. 29, № 6. P. 3121–3137.
115. Fletcher H.R., Biller P., Ross A.B., Adams J.M.M. The seasonal variation of fucoidan within three species of brown macroalgae // *Algal Res.* 2017. Vol. 22. P. 79–86.

116. Mak W., Hamid N., Liu T., Lu J., White W.L. Fucoïdan from New Zealand *Undaria pinnatifida*: Monthly variations and determination of antioxidant activities // *Carbohydr. Polym.* 2013. Vol. 95, № 1. P. 606–614.
117. Lahrsen E., Schoenfeld A.-K., Alban S. Size-dependent pharmacological activities of differently degraded fucoïdan fractions from *fucus vesiculosus* // *Carbohydr. Polym.* Elsevier Ltd., 2018. Vol. 189. P. 162–168.
118. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Ushakova N.A., Usov A.I., Kiselevskiy M. V, Nifantiev N.E. Fucoïdants: pro-or antiangiogenic agents? // *Glycobiology.* 2014. Vol. 24, № 12. P. 1265–1274.
119. Park J.H., Choi S.H., Park S.J., Lee Y.J., Park J.H., Song P.H., Cho C.M., Ku S.K., Song C.H. Promoting wound healing using low molecular weight fucoïdan in a full-thickness dermal excision rat model // *Mar. Drugs.* 2017. Vol. 15, № 4. P. 112-1-112–115.
120. Wang Z., Liu T., Chen X., You H., Zhang Q., Xue J., Zheng Y., Luo D. Low molecular weight fucoïdan ameliorates hindlimb ischemic injury in type 2 diabetic rats // *J. Ethnopharmacol.* Elsevier Ireland Ltd, 2018. Vol. 210. P. 434–442.
121. Marival N., Saboural P., Haddad O., Letourneur D., Charnaux N., Hlawaty H. Angiogenesis potentialized by highly sulfated fucoïdan: Role of the chemokines and the proteoglycans // *Arch. Cardiovasc. Dis. Suppl.* 2015. Vol. 2, № 7. P. 148.
122. Hwang P., Yan M., Kuo K., Phan N.N., Lin Y. A mechanism of low molecular weight fucoïdants degraded by enzymatic and acidic hydrolysis for the prevention of UVB damage // *J. Appl. Phycol. Journal of Applied Phycology*, 2016. Vol. 29. P. 521–529.
123. Rellve L., Nagasawa N., Luan L.Q., Yagi T., Aranilla C. Degradation of carrageenan by radiation // *Polym. Degrad. Stab.* 2005. Vol. 87, № 3. P. 403–410.
124. Lim S., Choi J., Park H. Antioxidant activities of fucoïdan degraded by gamma irradiation and acidic hydrolysis // *Radiat. Phys. Chem.* Elsevier, 2015. Vol. 109. P. 23–26.
125. Hou Y., Wang J., Jin W., Zhang H., Zhang Q. Degradation of *Laminaria japonica* fucoïdan by hydrogen peroxide and antioxidant activities of the degradation

- products of different molecular weights // *Carbohydr. Polym.* 2012. Vol. 87. P. 153–159.
126. Jo B.W., Choi S. Degradation of fucoidans from *Sargassum fulvellum* and their biological activities // *Carbohydr. Polym.* Elsevier Ltd., 2014. Vol. 111. P. 822–829.
127. Shi D., Qi J., Zhang H., Yang H., Yang Y., Zhao X. Comparison of hydrothermal depolymerization and oligosaccharide profile of fucoidan and fucosylated chondroitin sulfate from *Holothuria floridana* // *Int. J. Biol. Macromol.* Elsevier B.V., 2019. Vol. 132. P. 738–747.
128. Chand'ia N.P., Matsuhira B. Characterization of a fucoidan from *Lessonia vadosa* (Phaeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties // *Int. J. Biol. Macromol.* 2008. Vol. 42. P. 235–240.
129. Lahrsen E., Liewert I., Alban S. Gradual degradation of fucoidan from *Fucus vesiculosus* and its effect on structure, antioxidant and antiproliferative activities // *Carbohydr. Polym.* Elsevier Ltd., 2018. Vol. 192. P. 208–216.
130. Yuhao S.U.N., Xiaolin C., Song L.I.U. Preparation of low molecular weight *Sargassum fusiforme* polysaccharide and its anticoagulant activity // *J. Oceanol. Limnol.* 2018. Vol. 36, № 3. P. 882–891.
131. Flórez-fernández N., Torres M.D., González-muñoz M.J., Domínguez H. Potential of intensification techniques for the extraction and depolymerization of fucoidan // *Algal Res.* Elsevier, 2018. Vol. 30. P. 128–148.
132. Matsubara K., Xue C., Zhao X.U.E., Mori M., Tatsuya S. Effects of middle molecular weight fucoidans on in vitro and ex vivo angiogenesis of endothelial cells // *Int. J. Mol. Med.* 2005. Vol. 15, № 14. P. 695–699.
133. Xue C., Fang Y., Lin H., Chen L., Li Z., Deng D., Lu C. Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica* // *J. Appl. Phycol.* 2001. Vol. 13. P. 67–70.
134. Pomin V.H., Valente A.P., Pereira M.S., Mourão P.A.S. Mild acid hydrolysis of sulfated fucans: A selective 2-desulfation reaction and an alternative approach for preparing tailored sulfated oligosaccharides // *Glycobiology.* 2005. Vol. 15, № 12.

- P. 1376–1385.
135. Cao T. T. H., Maria D. M., Mateusz J. L., Ly M. B., Van T. T. T., Artem S. S., Mikhail I. K., Thinh D. P., Bang H. T., Holck J., Anne S. M. Novel enzyme actions for sulphated galactofucan depolymerisation and a new engineering strategy for molecular stabilisation of fucoidan // *Mar. Drugs*. 2018. Vol. 16, № 11. P. 1–18.
 136. Li B., Aid-launais R., Labour M., Zench A., Juenet M. Functionalized polymer microbubbles as new molecular ultrasound contrast agent to target P-selectin in thrombus // *Biomaterials*. 2019. Vol. 194. P. 139–150.
 137. Liu F., Wang J., Chang A.K., Liu B., Yang L., Li Q., Wang P., Zou X. Phytomedicine fucoidan extract derived from *Undaria pinnatifida* inhibits angiogenesis by human umbilical vein endothelial cells // *Eur. J. Integr. Med.* Elsevier GmbH., 2012. Vol. 19, № 8–9. P. 797–803.
 138. Yan J., Wang Y., Ma H., Wang Z. Ultrasonic effects on the degradation kinetics , preliminary characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *Phellinus linteus* mycelia // *Ultrason. Sonochem.* Elsevier B.V., 2016. Vol. 29. P. 251–257.
 139. Suslik K.S., Fang M., Hyeon T., Mdleleni M.. Applications of sonochemistry to materials synthesis // *Sonochemistry and Sonoluminescence*. 1999. P. 291–320.
 140. Mason T.J., Newman A.P., Phull S. Sonochemistry in water treatment // 2nd international conference on advances in water and effluent treatment. – Professional Engineering Publishing. 1993. P. 243–250.
 141. Xu H., Zeiger B.W., Suslick K.S. Sonochemical synthesis of nanomaterials // *Chem. Soc. Rev.* 2012. Vol. 42, № 7. P. 2555–2567.
 142. Portenlänger G., Heusinger H. The influence of frequency on the mechanical and radical effects for the ultrasonic degradation of dextrans // *Ultrason. Sonochem.* 1997. Vol. 4, № 2. P. 127–130.
 143. Liu H., Bao J., Du Y., Zhou X., Kennedy J.F. Effect of ultrasonic treatment on the biochemophysical properties of chitosan. 2006. Vol. 64. P. 553–559.
 144. Price G.J., Ashokkumar M., Hodnett M., Zequiri B. Acoustic emission from cavitating solutions : implications for the mechanisms of sonochemical reactions //

- J. Phys. Chem. 2005. Vol. 109, № 38. P. 17799–17801.
145. Guo X., Ye X., Sun Y., Wu D., Wu N., Hu Y., Chen S. Ultrasound effects on the degradation kinetics, structure, and antioxidant activity of sea cucumber fucoidan // J. Agric. Food Chem. 2014. Vol. 62, № 5. P. 1088–1095.
146. Raveendran S., Yoshida Y., Maekawa T., Kumar D.S. Pharmaceutically versatile sulfated polysaccharide based bionano platforms // Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. Elsevier, 2013. Vol. 9, № 5. P. 605–626.
147. Reddy L.C.N., Reddy R.S.P., Rao K.K.S. V, Subha M.C.S., Rao C.K. Development of polymeric blend microspheres from chitosan- hydroxypropylmethyl cellulose for controlled release of an anti-cancer drug // J. Korean Chem. Soc. 2013. Vol. 57, № 4. P. 439–446.
148. Kumari A., Yadav S.K., Yadav S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems // Colloids Surfaces B Biointerfaces. Elsevier, 2010. Vol. 75, № 1. P. 1–18.
149. Berkland C., King M., Cox A., Kim K. (Kevin), Pack D.W. Precise control of PLG microsphere size provides enhanced control of drug release rate // J. Control. Release. Elsevier, 2002. Vol. 82, № 1. P. 137–147.
150. Venkatesan J., Anil S., Kim S.-K., Shim M. Seaweed polysaccharide-based nanoparticles: preparation and applications for drug delivery // Polymers (Basel). 2016. Vol. 8, № 2. P. 30.
151. Jamshidi A., Shabanpour B., Pourashouri P., Raeisi M. Using WPC-inulin-fucoidan complexes for encapsulation of fish protein hydrolysate and fish oil in W1/O/W2 emulsion: Characterization and nutritional quality // Food Res. Int. Elsevier, 2018. Vol. 114. P. 240–250.
152. Hwang P.A., Lin X.Z., Kuo K.L., Hsu F.Y. Fabrication and cytotoxicity of fucoidan-cisplatin nanoparticles for macrophage and tumor cells // Materials (Basel). 2017. Vol. 10, № 3. P. 291-1-291–10.
153. Sezer A.D., Akbuğa J. Fucosphere - new microsphere carriers for peptide and protein delivery: preparation and in vitro characterization // J. Microencapsul. 2006. Vol. 23, № 5. P. 513–522.

154. Kim D.Y., Shin W.S. Unique characteristics of self-assembly of bovine serum albumin and fucoidan, an anionic sulfated polysaccharide, under various aqueous environments // *Food Hydrocoll.* 2015. Vol. 44. P. 471–477.
155. Lee E.J., Lim K.-H. Relative charge density model on chitosan–fucoidan electrostatic interaction: Qualitative approach with element analysis // *J. Biosci. Bioeng.* Elsevier, 2015. Vol. 119, № 2. P. 237–246.
156. Liu Y., Yao W., Wang S., Geng D., Zheng Q., Chen A. Preparation and characterization of fucoidan-chitosan nanospheres by the sonification method // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2014. Vol. 14, № 5. P. 3844–3849.
157. Huang Y.C., Li R.Y. Preparation and characterization of antioxidant nanoparticles composed of chitosan and fucoidan for antibiotics delivery // *Mar. Drugs.* 2014. Vol. 12, № 8. P. 4379–4398.
158. Huang Y.C., Chen J.K., Lam U.I., Chen S.Y. Preparing, characterizing, and evaluating chitosan/fucoidan nanoparticles as oral delivery carriers // *J. Polym. Res.* 2014. Vol. 21, № 5. P. 415:1-9.
159. Lu K.Y., Li R., Hsu C.H., Lin C.W., Chou S.C., Tsai M.L., Mi F.L. Development of a new type of multifunctional fucoidan-based nanoparticles for anticancer drug delivery // *Carbohydr. Polym.* 2017. Vol. 165. P. 410–420.
160. Ferreira S. A. Development of fucoidan/chitosan nanoparticulate systems for protein administration through mucosal routes. 2012. 53 p.
161. Sezer A.D., Akbuğa J. Comparison on in vitro characterization of fucospheres and chitosan microspheres encapsulated plasmid DNA (pGM-CSF): formulation design and release characteristics // *AAPS PharmSciTech.* 2009. Vol. 10, № 4. P. 1193–1199.
162. Sezer A.D., Akbuğa J. The design of biodegradable ofloxacin-based core-shell microspheres: Influence of the formulation parameters on in vitro characterization // *Pharm. Dev. Technol.* 2012. Vol. 17, № 1. P. 118–124.
163. Silva da L.C., Garcia T., Mori M., Sandri G., Bonferoni M.C., Finotelli P. V., Cinelli L.P., Caramella C., Cabral L.M. Preparation and characterization of polysaccharide-based nanoparticles with anticoagulant activity // *Int. J.*

- Nanomedicine. 2012. Vol. 7. P. 2975–2986.
164. Chen M.C., Wong H.S., Lin K.J., Chen H.L., Wey S.P., Sonaje K., Lin Y.H., Chu C.Y., Sung H.W. The characteristics, biodistribution and bioavailability of a chitosan-based nanoparticulate system for the oral delivery of heparin // *Biomaterials*. 2009. Vol. 30, № 34. P. 6629–6637.
 165. Chen C.H., Lin Y.S., Wu S.J., Mi F.L. Multifunctional nanoparticles prepared from arginine-modified chitosan and thiolated fucoidan for oral delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs // *Carbohydr. Polym.* Elsevier Ltd., 2018. Vol. 193. P. 163–172.
 166. Pinheiro A.C., Bourbon A.I., Cerqueira M.A., Maricato É., Nunes C., Coimbra M.A., Vicente A.A. Chitosan/fucoidan multilayer nanocapsules as a vehicle for controlled release of bioactive compounds // *Carbohydr. Polym.* 2015. Vol. 115. P. 1–9.
 167. Wang P., Kankala R.K., Fan J., Long R., Liu Y., Wang S. Poly-L-ornithine / fucoidan-coated calcium carbonate microparticles by layer-by-layer self-assembly technique for cancer theranostics // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* Springer US, 2018. Vol. 29, № 5. P. 68.
 168. Fan J., Liu Y., Wang S., Liu Y., Li S., Long R., Zhang R., Kankala R.K. Synthesis and characterization of innovative poly(lactide-co-glycolide)-(poly-L-ornithine/fucoidan) core-shell nanocarriers by layer-by-layer self-assembly // *RSC Adv.* 2017. Vol. 7. P. 32786–32794.
 169. Huang Y.-C., Kuo T.-H. O-carboxymethyl chitosan/fucoidan nanoparticles increase cellular curcumin uptake // *Food Hydrocoll.* Elsevier, 2016. Vol. 53. P. 261–269.
 170. Cunha L., Rodrigues S., da Costa A.M.R., Faleiro M.L., Buttini F., Grenha A. Inhalable fucoidan microparticles combining two antitubercular drugs with potential application in pulmonary tuberculosis therapy // *Polymers (Basel)*. 2018. Vol. 10, № 6. P. 636-1-636–19.
 171. Park S., Hwang S., Lee J. pH-responsive hydrogels from moldable composite microparticles prepared by coaxial electro-spray drying // *Chem. Eng. J.* Elsevier, 2011. Vol. 169, № 1–3. P. 348–357.

172. Sezer A.D., Cevher E. Topical drug delivery using chitosan nano- and microparticles // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2012. Vol. 9, № 9. P. 1129–1146.
173. Lee K.W., Jeong D., Na K. Doxorubicin loading fucoidan acetate nanoparticles for immune and chemotherapy in cancer treatment // *Carbohydr. Polym.* Elsevier, 2013. Vol. 94, № 2. P. 850–856.
174. Bonnard T., Serfaty J.M., Journé C., Ho Tin Noe B., Arnaud D., Louedec L., Derkaoui S.M., Letourneur D., Chauvierre C., Le Visage C. Leukocyte mimetic polysaccharide microparticles tracked in vivo on activated endothelium and in abdominal aortic aneurysm // *Acta Biomater.* Acta Materialia Inc., 2014. Vol. 10, № 8. P. 3535–3545.
175. Chiang C.S., Lin Y.J., Lee R., Lai Y.H., Cheng H.W., Hsieh C.H., Shyu W.C., Chen S.Y. Combination of fucoidan-based magnetic nanoparticles and immunomodulators enhances tumour-localized immunotherapy // *Nat. Nanotechnol.* Springer US, 2018. Vol. 13, № 8. P. 746–754.
176. Suzuki M., Bachelet-Violette L., Rouzet F., Beilvert A., Autret G., Maire M., Menager C., Louedec L., Choqueux C., Saboural P., Haddad O., Chauvierre C., Chaubet F., Michel J.B., Serfaty J.M., Letourneur D. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with fucoidan for molecular MRI of intraluminal thrombus // *Nanomedicine.* 2015. Vol. 14. P. 91–98.
177. Venkatesan J., Singh S.K., Anil S., Kim S.K., Shim M.S. Preparation, characterization and biological applications of biosynthesized silver nanoparticles with chitosan-fucoidan coating // *Molecules.* 2018. Vol. 23, № 6. P. 1429.
178. Jang B., Moorthy M.S., Manivasagan P., Xu L. Fucoidan-coated CuS nanoparticles for chemo- and photothermal therapy against cancer // *Oncotarget.* 2018. Vol. 9, № 16. P. 12649–12661.
179. Oliveira M., Amorim R., Lopes D., Araujo L., Lucas R., Viana S., Cristina S., Almeida-lima J., Silva L., Alexandre H., Rocha O. Fucan-coated silver nanoparticles synthesized by a green method induce human renal adenocarcinoma cell death // *Int. J. Biol. Macromol.* Elsevier B.V., 2016. Vol. 93. P. 57–65.
180. Lira M.C.B., Santos-Magalhães N.S., Nicolas V., Marsaud V., Silva M.P.C.,

- Ponchel G., Vauthier C. Cytotoxicity and cellular uptake of newly synthesized fucoidan-coated nanoparticles // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* Elsevier, 2011. Vol. 79, № 1. P. 162–170.
181. Silva V.A.J., Andrade P.L., Silva M.P.C., Bustamante A.D., De Los Santos Valladares L., Albino Aguiar J. Synthesis and characterization of Fe₃O₄ nanoparticles coated with fucan polysaccharides // *J. Magn. Magn. Mater.* Elsevier, 2013. Vol. 343. P. 138–143.
182. Moorthy, M. S., Subramanian, B., Panchanathan, M., Mondal, S., Kim, H., Lee, K. D., & Oh J. Fucoidan-coated core–shell magnetic mesoporous silica nanoparticles for chemotherapy and magnetic hyperthermia-based thermal therapy applications // *New J. Chem.* 2017. Vol. 41, № 24. P. 15334–15346.
183. Nguyen H., Tinet E., Chauveau T., Lalatonne Y., Michel A., Aid-launais R., Lef C. Bimodal fucoidan-coated zinc oxide/iron oxide-based nanoparticles for the imaging of atherothrombosis // *Mar. Drugs.* 2019. Vol. 24, № 5. P. 1–19.
184. Manivasagan P., Bharathiraja S., Santha Moorthy M., Oh Y.O., Song K., Seo H., Oh J. Anti-EGFR antibody conjugation of fucoidan-coated gold nanorods as novel photothermal ablation agents for cancer therapy // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2017. Vol. 9, № 17. P. 14633–14646.
185. Shin S.-W., Jung W., Choi C., Kim S.-Y., Son A., Kim H., Lee N., Park H.C. Fucoidan-manganese dioxide nanoparticles potentiate radiation therapy by co-targeting tumor hypoxia and angiogenesis // *Mar. Drugs.* 2018. Vol. 16, № 12. P. 510-1-510–516.
186. Elbi S., Nimal T.R., Rajan V.K., Baranwal G., Biswas R., Jayakumar R., Sathianarayanan S. Fucoidan coated ciprofloxacin loaded chitosan nanoparticles for the treatment of intracellular and biofilm infections of *Salmonella* // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* Elsevier B.V., 2017. Vol. 160. P. 40–47.
187. Li B., Juenet M., Aid-Launais R., Maire M., Ollivier V., Letourneur D., Chauvierre C. Development of polymer microcapsules functionalized with fucoidan to target P-selectin overexpressed in cardiovascular diseases // *Adv. Healthc. Mater.* 2017. Vol. 6, № 4. P. 1601200-1-1601200–1601211.

188. Hongje J., Kyungtae K., El-Sayeda M.A. Facile size controlled synthesis of fucoidan coated gold nanoparticles and cooperative anticancer effect with doxorubicin // *Mater. Chem. B.* 2017. Vol. 5, № 30. P. 6147–6153.
189. Cho Y.-S., Jung W.-K., Kim J.-A., Choi I.-W., Kim S.-K. Beneficial effects of fucoidan on osteoblastic MG-63 cell differentiation // *Food Chem. Elsevier*, 2009. Vol. 116, № 4. P. 990–994.
190. Park S., Lee K.W., Lim D.-S., Lee S. The sulfated polysaccharide fucoidan stimulates osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells // *Stem Cells Dev.* 2012. Vol. 21, № 12. P. 2204–2211.
191. Jin G., Kim G.H. Rapid-prototyped PCL/fucoidan composite scaffolds for bone tissue regeneration: design, fabrication, and physical/biological properties // *J. Mater. Chem.* 2011. Vol. 21, № 44. P. 17710.
192. Lee J.S., Jin G.H., Yeo M.G., Jang C.H., Lee H., Kim G.H. Fabrication of electrospun biocomposites comprising polycaprolactone/ fucoidan for tissue regeneration // *Carbohydr. Polym.* 2012. Vol. 90, № 1. P. 181–188.
193. Jin G., Kim G. Multi-layered polycaprolactone-alginate-fucoidan biocomposites supplemented with controlled release of fucoidan for bone tissue regeneration: Fabrication, physical properties, and cellular activities // *Soft Matter.* 2012. Vol. 8, № 23. P. 6264–6272.
194. Young A.T., Kang J.H., Kang D.J., Venkatesan J., Chang H.K., Bhatnagar I., Chang K.-Y., Hwang J.-H., Salameh Z., Kim S.-K., Kim H.T., Kim D.G. Interaction of stem cells with nano hydroxyapatite-fucoidan bionanocomposites for bone tissue regeneration // *Int. J. Biol. Macromol. Elsevier*, 2016. Vol. 93. P. 1488–1491.
195. Pajovich H. T., Banerjee I. A. Biomineralization of fucoidan-peptide blends and their potential applications in bone tissue regeneration // *J. Funct. Biomater.* 2017. Vol. 8, № 3. P. 41-1–41–22.
196. Puvanewary S., Talebian S., Raghavendran H.B., Murali M.R., Mehrali M., Afifi A.M., Kasim N.H.B.A., Kamarul T. Fabrication and in vitro biological activity of β TCP-Chitosan-Fucoidan composite for bone tissue engineering // *Carbohydr. Polym. Elsevier*, 2015. Vol. 134. P. 799–807.

197. Lowe B., Venkatesan J., Anil S., Shim M.S., Kim S.-K. Preparation and characterization of chitosan-natural nano hydroxyapatite-fucoidan nanocomposites for bone tissue engineering // *Int. J. Biol. Macromol. Elsevier*, 2016. Vol. 93. P. 1479–1487.
198. Lu H.T., Lu T.W., Chen C.H., Lu K.Y., Mi F.L. Development of nanocomposite scaffolds based on biomineralization of N,O-carboxymethyl chitosan/fucoidan conjugates for bone tissue engineering // *Int. J. Biol. Macromol. Elsevier B.V*, 2018. Vol. 120. P. 2335–2345.
199. Venkatesan J., Bhatnagar I., Kim S.K. Chitosan-alginate biocomposite containing fucoidan for bone tissue engineering // *Mar. Drugs*. 2014. Vol. 12, № 1. P. 300–316.
200. Colasuonno M., Palange A.L., Aid R., Ferreira M., Mollica H., Emdin M., Sette M. Del, Chauvierre C., Letourneur D., Decuzzi P. Erythrocyte-inspired discoidal polymeric nanoconstructs carrying tissue plasminogen activator for the enhanced lysis of blood clots // *ACS Nano*. 2018. Vol. 12, № 12. P. 12224–12237.
201. Chen H., Brash J.L. Blood compatible materials: state of the art // *J. Mater. Chem. B Mater. Biol. Med. Royal Society of Chemistry*, 2014. Vol. 2, № 35. P. 5718–5738.
202. Weisel J.W., Litvinov R.I. Fibrin formation, structure and properties // *Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms*. Cham: Springer, 2017. P. 405–456.
203. Jackson S.P. The growing complexity of platelet aggregation. 2019. Vol. 109, № 12. P. 5087–5096.
204. Brown A.E.X., Litvinov R.I., Discher D.E., Purohit P.K., Weisel J.W. Multiscale mechanics of fibrin polymer: gel stretching with protein unfolding and loss of water // *Science (80-.)*. 2010. Vol. 325, № 5941. P. 741–744.
205. Li C., Du H., Yang A., Jiang S., Li Z., Li D., Brash J.L., Hong C. Thrombosis-responsive thrombolytic coating based on thrombin-degradable tissue plasminogen activator (t-PA) nanocapsules // *Adv. Funct. Mater.* 2017. Vol. 27, № 45. P. 1703934.
206. Vivien D., Gauberti M., Montagne A., Defer G., Touze E. Impact of tissue

- plasminogen activator on the neurovascular unit : from clinical data to experimental evidence // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2011. Vol. 31, № 11. P. 2119–2134.
207. Bennett W.F., Paoni N.F., Keyt B.A., Botstein D., Jones A.J.S., Presta L., Wurm F.M., Zoller M.J. High resolution analysis of functional determinants on human tissue-type plasminogen activator // *J. Biol. Chem.* 1991. Vol. 266, № 8. P. 5191–5201.
208. Gurewich V. Why so little progress in therapeutic thrombolysis? The current state of the art and prospects for improvement // *J. Thromb. Thrombolysis.* 2015. Vol. 40, № 4. P. 480–487.
209. Absar S., Choi S., Ahsan F., Cobos E., Yang V.C., Kwon Y.M. Preparation and characterization of anionic oligopeptide-modified tissue plasminogen activator for triggered delivery: An approach for localized thrombolysis // *Thromb. Res. Pergamon*, 2013. Vol. 131, № 3. P. e91–e99.
210. Chung T.W., Wang S.S., Tsai W.J. Accelerating thrombolysis with chitosan-coated plasminogen activators encapsulated in poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles // *Biomaterials.* 2008. Vol. 29, № 2. P. 228–237.
211. Kaminski M.D., Xie Y., Mertz C.J., Finck M.R., Chen H., Rosengart A.J. Encapsulation and release of plasminogen activator from biodegradable magnetic microcarriers // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2008. Vol. 35, № 1–2. P. 96–103.
212. Kim J., 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.
213. Hu J., Huang S., Zhu L., Huang W., Zhao Y., Jin K., Zhuge Q. Tissue plasminogen activator-porous magnetic microrods for targeted thrombolytic therapy after ischemic stroke // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2018. Vol. 10, № 39. P. 32988–32997.
214. Leach J.K., Patterson E., O’Rear E.A. Distributed intraclot thrombolysis: Mechanism of accelerated thrombolysis with encapsulated plasminogen activators // *J. Thromb. Haemost.* 2004. Vol. 2, № 9. P. 1548–1555.
215. Tiukinhoy-laing S.D., Huang S., Klegerman M., Holland C.K., Mcpherson D.D.

- Ultrasound-facilitated thrombolysis using tissue-plasminogen activator-loaded echogenic liposomes // *Thromb. Res.* 2007. Vol. 119, № 6. P. 777–784.
216. Peng T., McPherson D.D., Huang S., Shekhar H., Bader K.B., Huang S., Holland C.K. In vitro thrombolytic efficacy of echogenic liposomes loaded with tissue plasminogen activator and octafluoropropane gas // *Phys. Med. Biol.* IOP Publishing, 2016. Vol. 62, № 2. P. 517–538.
217. Uesugi Y., Kawata H., Jo J., Saito Y., Tabata Y. An ultrasound-responsive nano delivery system of tissue-type plasminogen activator for thrombolytic therapy // *J. Control. Release.* Elsevier B.V., 2010. Vol. 147, № 2. P. 269–277.
218. Can K., Ozmen M., Ersoz M. Immobilization of albumin on aminosilane modified superparamagnetic magnetite nanoparticles and its characterization // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2009. Vol. 71, № 1. P. 154–159.
219. Liu Y., Li Y. An antibody-immobilized capillary column as a bioseparator/bioreactor for detection of *Escherichia coli* 0157:H7 with absorbance measurement // *Anal. Chem.* 2001. Vol. 73, № 21. P. 5180–5183.
220. Mateo C., Palomo J.M., Fernandez-lorente G., Guisan J.M., Fernandez-lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. 2007. Vol. 40. P. 1451–1463.
221. Kempe H., Kempe M. The use of magnetite nanoparticles for implant-assisted magnetic drug targeting in thrombolytic therapy // *Biomaterials.* Elsevier Ltd, 2010. Vol. 31, № 36. P. 9499–9510.
222. Ma Y.H., Wu S.Y., Wu T., Chang Y.J., Hua M.Y., Chen J.P. Magnetically targeted thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator bound to polyacrylic acid-coated nanoparticles // *Biomaterials.* Elsevier Ltd, 2009. Vol. 30, № 19. P. 3343–3351.
223. Liu S., Feng X., Jin R., Li G. Tissue plasminogen activator-based nanothrombolysis for ischemic stroke // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2017. Vol. 15, № 2. P. 173–184.
224. Fukuta T., Yanagida Y., Asai T., Oku N. Co-administration of liposomal fasudil and tissue plasminogen activator ameliorated ischemic brain damage in occlusion

- model rats prepared by photochemically induced thrombosis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Elsevier Ltd, 2018. Vol. 495, № 1. P. 873–877.
225. Hsu H.L., Chen J.P. Preparation of thermosensitive magnetic liposome encapsulated recombinant tissue plasminogen activator for targeted thrombolysis // *J. Magn. Magn. Mater.* Elsevier, 2017. Vol. 427. P. 188–194.
226. Wang S., Chou N., Chung T. The t-PA-encapsulated PLGA nanoparticles shelled with CS or CS-GRGD alter both permeation through and dissolving patterns of blood clots compared with t-PA solution: An in vitro thrombolysis study // *J. Biomed. Mater. Res. Part A An Off. J. Soc. Biomater. Japanese Soc. Biomater. Aust. Soc. Biomater. Korean Soc. Biomater.* 2008. Vol. 91, № 3. P. 753–761.
227. Uesugi Y., Kawata H., Saito Y., Tabata Y. Ultrasound-responsive thrombus treatment with zinc-stabilized gelatin nano-complexes of tissue-type plasminogen activator // *J. Drug Target.* 2012. Vol. 20, № 3. P. 224–234.
228. Deng J., Mei H., Shi W., Pang Z., Zhang B., Guo T., Wang H., Jiang X., Hu Y. Recombinant tissue plasminogen activator-conjugated nanoparticles effectively targets thrombolysis in a rat model of middle cerebral artery occlusion // *Curr. Med. Sci.* 2018. Vol. 38, № 3. P. 427–435.
229. Hu J., Huang W., Huang S., ZhuGe Q., Jin K., Zhao Y. Magnetically active Fe₃O₄ nanorods loaded with tissue plasminogen activator for enhanced thrombolysis // *Nano Res.* 2016. Vol. 9, № 9. P. 2652–2661.
230. Chen J., Yang P., Ma Y., Wu T. Characterization of chitosan magnetic nanoparticles for in situ delivery of tissue plasminogen activator // *Carbohydr. Polym.* Elsevier Ltd., 2011. Vol. 84, № 1. P. 364–372.
231. Chen J.P., Liu C.H., Hsu H.L., Wu T., Lu Y.J., Ma Y.H. Magnetically controlled release of recombinant tissue plasminogen activator from chitosan nanocomposites for targeted thrombolysis // *J. Mater. Chem. B.* Royal Society of Chemistry, 2016. Vol. 4, № 15. P. 2578–2590.
232. Heid S., Boccaccini A., Eberbeck D., Weigel B., Lyer S., Alexiou C., Cicha I., Tietze R., Unterweger H., Friedrich R. Synthesis and characterization of tissue plasminogen activator—functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles

- for targeted fibrin clot dissolution // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18, № 9. P. 1837(1-21).
233. Tu S. Targeted delivery of tissue plasminogen activator by binding to silica-coated magnetic nanoparticle // *Int. J. Nanomedicine.* 2012. Vol. 12. P. 5137–5149.
234. Friedrich R.P., Zaloga J., Schreiber E., Tóth I.Y., Tombácz E., Lyer S., Alexiou C. Tissue plasminogen activator binding to superparamagnetic iron oxide nanoparticle—covalent versus adsorptive approach // *Nanoscale Res. Lett. Nanoscale Research Letters*, 2016. Vol. 11, № 1. P. 297.
235. Voros E., Cho M., Ramirez M., Palange A.L., De Rosa E., Key J., Garami Z., Lumsden A.B., Decuzzi P. TPA immobilization on iron oxide nanocubes and localized magnetic hyperthermia accelerate blood clot lysis // *Adv. Funct. Mater.* 2015. Vol. 25, № 11. P. 1709–1718.
236. Zhou J., Guo D., Zhang Y., Wu W., Ran H., Wang Z. Construction and evaluation of Fe₃O₄-based PLGA nanoparticles carrying rtPA used in the detection of thrombosis and in targeted thrombolysis // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2014. Vol. 6, № 8. P. 5566–5576.
237. Absar S., Kwon Y.M., Ahsan F. Bio-responsive delivery of tissue plasminogen activator for localized thrombolysis // *J. Control. Release. Elsevier B.V.*, 2014. Vol. 177, № 1. P. 42–50.
238. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Popivnich I.B., Isakov V. V., Scobun A.S., Sundukova E. V., Elyakova L.A. A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweeds // *Carbohydr. Res.* 1999. Vol. 322, № 1–2. P. 32–39.
239. Кунижев С.М., Денисова Е.В. Высокомолекулярный полисахарид из бурых водорослей: исследование условий экстрагирования // *Наука. Инновации. Технологии.* 2003. № 34. С. 126–131.
240. Zhukova Y., Ulasevich S.A., Dunlop J.W.C., Fratzl P., Möhwald H., Skorb E. V. Ultrasound-driven titanium modification with formation of titania based nanofoam surfaces // *Ultrason. Sonochem.* 2017. Vol. 36. P. 146–154.
241. Drozdov A.S., Ivanovski V., Avnir D., Vinogradov V. V. A universal magnetic

- ferrofluid: Nanomagnetite stable hydrosol with no added dispersants and at neutral pH // *J. Colloid Interface Sci.* Elsevier Inc., 2016. Vol. 468. P. 307–312.
242. O'Neill A.N. Sulphated derivatives of laminarin // *Can. J. Chem.* 1956. Vol. 33, № 3698. P. 1097–1101.
243. Saito H., Yamagata T., Suzuki S. Enzymatic methods for the determination of small quantities of isomeric chondroitin sulfates. // *J. Biol. Chem.* 1968. Vol. 243, № 7. P. 1536–1542.
244. Gracher A.H.P., Santana A.G., Cipriani T.R., Iacomini M. A procoagulant chemically sulfated mannan // *Carbohydr. Polym.* 2016. Vol. 136. P. 177–186.
245. Dodgson K. S., Price R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides // *Biochem. J.* 1962. Vol. 84, № 1. P. 106–110.
246. Maltas E., Ozmen M., Vural H.C., Yildiz S., Ersoz M. Immobilization of albumin on magnetite nanoparticles // *Mater. Lett.* Elsevier B.V., 2011. Vol. 65, № 23–24. P. 3499–3501.
247. Baxter S., Zivanovic S., Weiss J. Molecular weight and degree of acetylation of high-intensity ultrasonicated chitosan // *Food Hydrocoll.* 2005. Vol. 19. P. 821–830.
248. Ogutu F., Mu T. Ultrasonic degradation of sweet potato pectin and its antioxidant activity // *Ultrason. Sonochem.* Elsevier B.V., 2016. Vol. 38. P. 726–734.
249. Zhang L., Ye X., Xue J., Zhang X., Liu D., Chen S. Effect of high-intensity ultrasound on the physicochemical properties and nanostructure of citrus pectin // *J. Sci. Food Agric.* 2013. Vol. 93, № 8. P. 2028–2036.
250. Mason J., Cuthbert C., Brookfield A. Effect of ultrasound on the degradation of aqueous native dextran // *Ultrason. Sonochem.* 1995. Vol. 2, № 1. P. 1–3.
251. Lii C., Chen C., Yeh A., Lai V.M. Preliminary study on the degradation kinetics of agarose and carrageenans by ultrasound // *Food Hydrocoll.* 1999. Vol. 13, № 6. P. 477–481.
252. Aimin T., Hongwei Z., Gang C., Guohui X., Wenzhi L. Influence of ultrasound treatment on accessibility and regioselective oxidation reactivity of cellulose // *Ultrason. Sonochem.* 2005. Vol. 12, № 6. P. 467–472.
253. Li R., Feke D.L. Rheological and kinetic study of the ultrasonic degradation of

- xanthan gum in aqueous solution : Effects of pyruvate group // *Carbohydr. Polym.* Elsevier Ltd., 2015. Vol. 124. P. 216–221.
254. Koda S., Taguchi K., Futamura K. Ultrasonics Sonochemistry Effects of frequency and a radical scavenger on ultrasonic degradation of water-soluble polymers // *Ultrason. Sonochem.* Elsevier B.V., 2011. Vol. 18, № 1. P. 276–281.
255. Pirkonen P., Heikkinen J., Ihalainen J., Mursunen H., Sekki H., Gr A. Ultrasonic depolymerization of aqueous polyvinyl alcohol // *Ultrason. Sonochem.* 2001. Vol. 8. P. 259–264.
256. Price G.J., Ashokkumar M., Grieser F. Sonoluminescence quenching by organic acids in aqueous solution : pH and frequency effects // *J. Am. Chem. Soc.* 2018. Vol. 126, № 16. P. 2755–2762.
257. Kollath A., Brezhneva N., Skorb E. V., Andreeva D. V. Microbubbles trigger oscillation of crystal size in solids // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2017. Vol. 19, № 8. P. 6286–6291.
258. Yang L., Fu S., Zhu X., Zhang L., Yang Y., Yang X. Hyperbranched acidic polysaccharide from green tea // *Biomacromolecules.* 2010. Vol. 11, № 12. P. 3395–3405.
259. Tao Y., Zhang L. Determination of molecular size and shape of hyperbranched polysaccharide in solution // *Biopolymers.* 2006. Vol. 83, № 4. P. 414–423.
260. Zhou X.Y., Liu R.L., Ma X., Zhang Z.Q. Polyethylene glycol as a novel solvent for extraction of crude polysaccharides from pericarpium granati // *Carbohydr. Polym.* Elsevier Ltd., 2014. Vol. 101, № 1. P. 886–889.
261. Ashokkumar M., Hodnett M., Zeqiri B., Grieser F., Price G.J. Acoustic emission spectra from 515 kHz cavitation in aqueous solutions containing surface-active solutes // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. Vol. 129, № 8. P. 2250–2258.
262. Henglein A. Contribution to various aspects of cavitation chemistry // *J. Am. Chem. Soc.* 1993. Vol. 3. P. 17–83.
263. Wood R.J., Lee J., Wood R.J., Lee J., Bussemaker M.J. A parametric review of sonochemistry : Control and augmentation of sonochemical activity in aqueous solutions // *Ultrason. Sonochem.* Elsevier B.V., 2017. Vol. 38. P. 351–370.

264. Storey B.D., Szeri A.J. Water vapour , sonoluminescence and sonochemistry // Proc. R. Soc. London. Ser. A Math. Phys. Eng. Sci. 2000. Vol. 456, № 1999. P. 1685–1709.
265. Lin J.C., Hu C.Y., Lo S.L. Effect of surfactants on the degradation of perfluorooctanoic acid (PFOA) by ultrasonic (US) treatment // Ultrason. Sonochem. Elsevier B.V., 2016. Vol. 28. P. 130–135.
266. Ключев М.В., Голубева Н.Н., Гарина О.В., Галашина В.Н. Стабилизация водных растворов пероксида водорода полимерами // Текстильная химия. 1998. Vol. 1, № 13. P. 46–48.
267. Rocha De Souza M.C., Marques C.T., Guerra Dore C.M., Ferreira Da Silva F.R., Oliveira Rocha H.A., Leite E.L. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds // J. Appl. Phycol. 2007. Vol. 19, № 2. P. 153–160.
268. Tsaih M.L., Chen R.H. Effect of degree of deacetylation of chitosan on the kinetics of ultrasonic degradation of chitosan // J. Appl. Polym. Sci. 2003. Vol. 90, № 13. P. 3526–3531.
269. Zhang Z., Zhang Q., Wang J., Song H., Zhang H., Niu X. Chemical modification and influence of function groups on the in vitro-antioxidant activities of porphyran from *Porphyra haitanensis* // Carbohydr. Polym. Elsevier Ltd, 2010. Vol. 79, № 2. P. 290–295.
270. Álvarez-Viñas M., Flórez-Fernández N., González-Muñoz M.J., Domínguez H. Influence of molecular weight on the properties of *Sargassum muticum* fucoidan // Algal Res. Elsevier, 2019. Vol. 38. P. 101393.
271. He J., Xu Y., Chen H., Sun P. Extraction, structural characterization, and potential antioxidant activity of the polysaccharides from four seaweeds // Int. J. Mol. Sci. 2016. Vol. 17, № 12. P. 1988.
272. Wang Y., Xing M., Cao Q., Ji A., Liang H., Song S. Biological activities of fucoidan and the factors mediating its therapeutic effects : a review of recent studies // Mar. Drugs. 2019. Vol. 17, № 3. P. 183.
273. Владимиров Г.К., Сергунова Е.В., Измайлов Д.Ю., Владимиров Ю.А. Хемилюминесцентная методика определения общей антиоксидантной

- емкости в лекарственном растительном сырье // Вестник РГМУ. 2016. Вып. 2. С. 65–72.
274. Matsubara K., Matsuura Y., Basic A., Liao M. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2001. Vol. 28, № 5. P. 395–399.
275. De Zoysa M., Nikapitiya C., Jeon Y.J., Jee Y., Lee J. Anticoagulant activity of sulfated polysaccharide isolated from fermented brown seaweed *Sargassum fulvellum* // *J. Appl. Phycol.* 2008. Vol. 20, № 1. P. 67–74.
276. Nishino T., Aizu Y., Nagumo T. The influence of sulfate content and molecular weight of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome* on its antithrombin activity // *Trombos. Res.* 1991. Vol. 64. P. 723–731.
277. Athukorala Y., Jung W., Vasanthan T., Jeon Y. An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava* // *Carbohydr. Polym.* 2006. Vol. 66, № 2. P. 184–191.
278. Zhu Z., Zhang Q., Chen L., Ren S., Xu P., Tang Y., Luo D. Higher specificity of the activity of low molecular weight fucoidan for thrombin-induced platelet aggregation // *Thromb. Res. Elsevier Ltd*, 2010. Vol. 125, № 5. P. 419–426.
279. Pomin V.H., Mour P.A.S. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans // *Glycobiology.* 2008. Vol. 18, № 12. P. 1016–1027.
280. Nishino T., Nagumo T. The sulfate-content dependence of the anticoagulant of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia* // *Carbohydr. Res.* 1991. Vol. 214, № 1. P. 193–197.
281. Khan A.K., Saba A.U., Nawazish S., Akhtar F., Rashid R., Mir S., Nasir B., Iqbal F., Afzal S., Pervaiz F., Murtaza G. Carrageenan based bionanocomposites as drug delivery tool with special emphasis on the influence of ferromagnetic nanoparticles // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017. Vol. 2017. P. 1–13.
282. Li X., Chang W., Chao Y.J., Wang R., Chang M. Nanoscale structural and mechanical characterization of a natural nanocomposite material: the shell of red fbalone // *Nanoscale Lett.* 2014. Vol. 4, № 4. P. 613–617.
283. Антипина М.Н. Разработка полимерных мультислойных капсул для

- обеспечения оптимального биоэффекта лекарственных препаратов и активных веществ: дис. ... канд. физ.-мат. наук. Саратов, 2016. 210 с.
284. Mahdavinia G.R., Rahmani Z., Karami S., Pourjavadi A. Magnetic/pH-sensitive κ-carrageenan/sodium alginate hydrogel nanocomposite beads: Preparation, swelling behavior, and drug delivery // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2014. Vol. 25. № 17. P. 1891–1906.
285. Сухов Б.Г., Александрова Г.П., Грищенко Л.А., Феактистова Л.П., Сапожников А.Н., Пройдакова О.А., Тьков А.В., Медведева С.А., Трофимов Б.А. Нанобиокомпозиты благородных металлов на основе арабиногалактана: получение и строение // *Журнал структурной химии.* 2007. Вып. 48, № 5. С. 979–984.
286. Станиславов А.С., Яновская А.А., Кузнецов В.Н., Суходуб Л.Б., Суходуб Л.Ф. Сравнение способов получения сферических наночастиц магнетита в полисахаридных оболочках // *Журнал нано- та електронної фізики.* 2015. Вып. 7. № 2. P. 02009-1-02009–6.
287. Illés E., Tombácz E. The effect of humic acid adsorption on pH-dependent surface charging and aggregation of magnetite nanoparticles // *J. Colloid Interface Sci.* 2006. Vol. 295, № 1. P. 115–123.
288. Свирщевская Е.В., Гриневич Р.С., Решетов П.Д., Зубов В.П., Зубарева А.А., Ильина А.В., Варламов В.П. Наноносители лекарств на основе хитозана // *Бионанотехнологии и нанобиоматериаловедение.* 2012. Вып. 1. № 19. P. 13–20.
289. Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice // *Pharmacol. Rev.* 2001. Vol. 53. № 2. P. 283–318.
290. Polyak B., Friedman G. Magnetic targeting for site-specific drug delivery: applications and clinical potential // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2009. Vol. 6, № 1. P. 53–70.
291. Ali A., Ahmed S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery // *Int. J. Biol. Macromol. Elsevier B.V.,* 2018. Vol. 109. P. 273–286.

292. Meng F., Zhong Z., Feijen J. Review on stimuli-responsive polymersomes for programmed drug // *Biomacromolecules*. 2009. Vol. 10, № 2. P. 197–209.
293. Cajot S., Lautram N., Passirani C., Jérôme C. Design of reversibly core cross-linked micelles sensitive to reductive environment // *J. Control. Release. Elsevier B.V.*, 2011. Vol. 152, № 1. P. 30–36.
294. Long J., Yu X., Xu E., Wu Z., Xu X., Jin Z. In situ synthesis of new magnetite chitosan / carrageenan nanocomposites by electrostatic interactions for protein delivery applications // *Carbohydr. Polym. Elsevier Ltd.*, 2015. Vol. 131. P. 98–107.
295. Rajesh Kumar S., Priyatharshni S., Babu V.N., Mangalaraj D., Viswanathan C., Kannan S., Ponpandian N. Quercetin conjugated superparamagnetic magnetite nanoparticles for in-vitro analysis of breast cancer cell lines for chemotherapy applications // *J. Colloid Interface Sci. Elsevier Inc.*, 2014. Vol. 436. P. 234–242.
296. Kozlov N.K., Natashina U.A., Tamarov K.P., Gongalsky M.B., Solovyev V. V, Kudryavtsev A.A., Sivakov V., Osminkina L.A. Recycling of silicon: from industrial waste to biocompatible nanoparticles for nanomedicine Recycling of silicon: from industrial waste to biocompatible nanoparticles for nanomedicine // *Mater. Res. Express. IOP Publishing*, 2017. Vol. 4, № 9. P. 095026.
297. Goya G.F., Berquó T.S., Fonseca F.C., Morales M.P., Fonseca F.C. Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles // *J. Appl. Phys.* 2003. Vol. 94, № 5. P. 3520–3528.
298. Park J., Kadasala N.R., Abouelmagd S.A., Castanares M.A., David S., Wei A., Yeo Y., Pharmacy P., Lafayette W., Lilly E., Lafayette W., Lafayette W. Polymer–iron oxide composite nanoparticles for EPR-independent drug delivery // *Biomaterials*. 2016. Vol. 101. P. 285–295.
299. Gee S.H., Hong Y.K., Erickson D.W., Park M.H., Sur J.C., Gee S.H., Hong Y.K., Erickson D.W., Park M.H. Synthesis and aging effect of spherical magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles for biosensor applications // *J. Appl. Phys.* 2003. Vol. 93, № 10. P. 7560–7562.

300. Silva V.A.J., Andrade P.L., Bustamante A., de los Santos Valladares L., Mejia M., Souza I.A., Cavalcanti K.P.S., Silva M.P.C., Aguiar J.A. Magnetic and Mössbauer studies of fucan-coated magnetite nanoparticles for application on antitumoral activity // *Hyperfine Interact.* 2014. Vol. 224, № 1–3. P. 227–238.
301. Babincová M. Microwave induced linkage of magnetoliposomes. Possible clinical implications // *Bioelectrochemistry Bioenerg.* 1993. Vol. 32, № 2. P. 187–189.
302. Wolberg A.S. Thrombin generation and fibrin clot structure // *Blood Rev.* 2007. Vol. 21, № 3. P. 131–142.
303. Дроздов С.А. Синтез и физико-химические свойства новых типов функциональных наноматериалов на основе магнетита: дис. ... канд. хим. наук. Санкт-Петербург, 2017. 152 с.
304. 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.
305. Zayed A., Hahn T., Finkelmeier D., Burger-Kentischer A., Rupp S., Krämer R., Ulber R. Phenomenological investigation of the cytotoxic activity of fucoidan isolated from *Fucus vesiculosus* // *Process Biochem.* Elsevier, 2019. Vol. 81. P. 182–187.