

## СОЗДАНИЕ И СВОЙСТВА БИОКОМПОЗИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ФУКОИДАНА КАК НОСИТЕЛЕЙ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА

**В.Е. Супрунчук**

Виктория Евгеньевна Супрунчук (ORCID 0000-0002-5587-8262)

Кафедра физики и технологии наноструктур и материалов, Северо-Кавказский федеральный университет, ул. Пушкина, 1а, Ставрополь, Российская Федерация, 355000

E-mail: vsuprunchuk@ncfu.ru

*Биодеградируемые наноконпозиты, обладающие способностью к магнитному наведению, являются новым классом функциональных материалов, способствующих расширению возможностей клинической терапии. В работе описан химизм формирования нанобиоконпозитного материала на основе природного полимера, синтезированного путем электростатического взаимодействия полисахарида и магнетита в водной среде. Изучена возможность электростатической иммобилизации модельного фибринолитического фермента. Методом динамического рассеяния света установлено повышение электрохимического потенциала частиц при иммобилизации фибринолитического фермента. Степень включения фермента составила  $9,95 \pm 0,05$  масс.%. Средний размер частиц нанобиоконпозитного материала после иммобилизации фермента составил 264,3 нм. Исследование магнитных свойств показало отсутствие остаточной намагниченности, что позволяет исключить возможность магнитного агрегирования при применении биоконпозита в биологическом приложении. Намагниченность насыщения сформированного материала составила  $57,1 \pm 2,3$  кА/м, что ниже, чем у золя чистого магнетита ( $M_s \sim 73,8 \pm 3,4$  кА/м), однако достаточно для манипулирования в условиях сопротивления кровотоку. Изучены кинетические закономерности высвобождения ферментного препарата в фосфатном буфере из наноконпозитного носителя на основе фукоидана. Для изучения кинетики высвобождения фермента методом математического моделирования были использованы модели нулевого и первого порядка, модель Корсмейера-Пеппаса, модель Хигучи, модель Бейкера-Лонсдейла. Кинетика высвобождения фибринолитического фермента с высокой точностью ( $r^2 = 0,98$ ) описывается уравнением Корсмейера-Пеппаса, где на процесс релиза ферментного препарата оказывает влияние диффузия, подчиняющаяся закону Фика. Установлено, что модели нулевого и первого порядка применимы только к начальному (0-40 мин, где  $r^2 = 0,96$ ) и конечному (80-320 мин,  $r^2 = 0,93$ ) этапу релиза.*

**Ключевые слова:** фукоидан, магнетит, тканевой активатор плазминогена, наночастицы, нанобиоконпозит

## CREATION AND PROPERTIES OF BIOCOMPOSITE NANOPARTICLES BASED ON FUCOIDAN AS CARRIERS OF FIBRINOLYTIC ENZYME

**V.E. Suprunchuk**

Victoria E. Suprunchuk (ORCID 0000-0002-5587-8262)

Department of Physics and Technology of Nanostructures and Materials, North-Caucasus Federal University, Pushkin st., 1a, Stavropol, 355000, Russia

E-mail: vsuprunchuk@ncfu.ru

*Magnetically guided biodegradable nanocomposites are a new class of functional materials that expand the possibilities of clinical therapy. The paper describes the chemistry of the formation of a nanobiocomposite material based on a natural polymer synthesized by electrostatic interaction*

*of a polysaccharide and magnetite in an aqueous medium. The possibility of electrostatic immobilization of a model fibrinolytic enzyme was studied. An increase in the electrochemical potential of particles during immobilization of a fibrinolytic enzyme was established by the method of dynamic light scattering. The degree of enzyme inclusion was  $9.95 \pm 0.05$  mass%. The average particle size of the nanobiocomposite material after immobilization of the enzyme was 264.3 nm. The study of the magnetic properties showed the absence of residual magnetization, which makes it possible to exclude the possibility of magnetic aggregation when using the biocomposite in a biological application. The saturation magnetization of the formed material was  $57.1 \pm 2.3$  kA/m, which is lower than that of pure magnetite sol ( $M_s \sim 73.8 \pm 3.4$  kA/m), but sufficient for manipulation under conditions of resistance to blood flow. The kinetics of the release of an enzyme preparation in a phosphate buffer from a nanocomposite carrier based on fucoidan was studied. To study the kinetics of enzyme release by mathematical modeling, zero and first order models, the Korsmeier-Peppas model, the Higuchi model, and the Baker-Lonsdale model were used. It has been established that the kinetics of fibrinolytic enzyme release is described with high accuracy ( $r^2 = 0.98$ ) by the Korsmeier-Peppas equation, where the process of release of the enzyme preparation is influenced by diffusion obeying Fick's law. It has been established that zero and first order models are applicable only to the initial (0-40 min, where  $r^2 = 0.96$ ) and final (80-320 min,  $r^2 = 0.93$ ) stage of release.*

**Key words:** fucoidan, magnetite, tissue plasminogen activator, nanoparticles, nanobiocomposite

**Для цитирования:**

Супрунчук В.Е. Создание и свойства биокomпозитных наночастиц на основе фукоидана как носителей фибринолитического фермента. *Изв. вузов. Химия и хим. технология.* 2023. Т. 66. Вып. 5. С. 87–95. DOI: 10.6060/ivkkt.20236605.6680.

**For citation:**

Suprunchuk V.E. Creation and properties of biocomposite nanoparticles based on fucoidan as carriers of fibrinolytic enzyme. *ChemChemTech [Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.]*. 2023. V. 66. N 5. P. 87–95. DOI: 10.6060/ivkkt.20236605.6680.

## ВВЕДЕНИЕ

Самым распространенным тромболитическим агентом в клинической практике является тканевый активатор плазминогена (tPA). tPA является представителем второго поколения тромболитиков и одобрен в качестве эффективного средства лечения острого ишемического инсульта. Однако tPA имеет очень короткий период полураспада в кровотоке (всего несколько минут), а высокие концентрации приводят к воздействию на интактный фибрин, поэтому стоит проблема увеличения времени циркуляции этого фермента в крови, в том числе за счет применения носителя. На сегодняшний день существуют различные подходы к решению данной проблемы, например, инкапсуляция фермента в липосомы, микросферы поли(лактид-ко-гликолида) (PLGA) [1] или иммобилизация на предварительно подготовленные наночастицы магнетита [2], маггемита [3], никелиевых наностержней [4], а также методы защиты тканевого активатора плазминогена, направленные на подавление его ферментативной активности в кровяном русле с предположением его активации при взаимодействии с тромбином [5]. Но не один из существующих подходов до сих пор не прошел клинические

испытания, не применяется в клинической практике и не является эталонным.

Фукоидан представляет собой сульфатированный гетерополисахарид, выделяемый из бурых водорослей, основным мономером которого является L-фукоза. Известно, что этот биополимер обладает противомикробной [6], противовоспалительной [7], антикоагулянтной [8, 9], противовирусной [10], иммуномодулирующей [11] активностью и др. Доступность источника фукоидана, широкий спектр его биологического действия, биосовместимость, отсутствие токсичности свидетельствуют о возможности получения новых типов фармацевтических композиций на его основе. Кроме того, фукоидан обладает такой важной особенностью, позволяющей использовать его в разработке материалов для борьбы с тромботическими явлениями, как способность связываться с P-селектином [12]. P-селектин – это белок молекулярной адгезии, суперэкспрессируемый активированными тромбоцитами, которые в большом количестве локализируются в тромбе [13, 14]. Таким образом, фукоидан может выступать как тромб-направленный вектор при конъюгации с лекарственными веществами тромболитического действия. С другой сто-

роны, дополнительная функционализация фукоидана наночастицами магнетита позволит создавать магнитоуправляемые системы доставки тромболитического агента с целью его локального действия и контролируемого биораспределения носителя, что может способствовать повышению эффективности лечения. Кроме того, магнитное поле, используемое для манипулирования такими структурами, способно выполнять роль механического триггера и модулировать высвобождение ферментного препарата [15]. Ранее в работе [16] был осуществлен синтез нанобиокомпозитного материала фукоидан/магнетит. Однако ковалентная иммобилизация тромболитического агента продемонстрировала низкий показатель включения фермента ( $2,06 \pm 0,09$  масс.%) и небольшое значение электрохимического потенциала поверхности частиц, что привело к их агрегированию. Поэтому в данной работе рассматривается создание нанобиокомпозитного носителя на основе фукоидана путем иммобилизации фибринолитического фермента за счет сил электростатического взаимодействия.

В исследовании были использованы биокомпозитные наночастицы, полученные путем смешения водных растворов фукоидана и магнетита (Фук@М) с последующей электростатической иммобилизацией фибринолитического фермента. Для характеристики образцов был использован метод фотонной корреляционной спектроскопии и метод определения магнитных свойств с помощью вибрационного магнитометра. В работе экспериментально изучена способность носителя к загрузке тромболитического агента за счет сил электростатического взаимодействия, а также рассмотрена кинетика выпуска ферментного препарата с подбором математической модели для ее описания.

#### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Исходным сырьем для создания нанобиокомпозитного носителя явился фукоидан, полученный из бурой водоросли *Fucus vesiculosus* по методике [17], с последующей очисткой [18] и ультразвуковой деструкцией [19]. Суспензия магнетита была получена методом химического осаждения ионов  $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$  [20] со средним гидродинамическим диаметром частиц  $32,5 \pm 9,6$  нм и электрохимическим потенциалом  $+28,54 \pm 0,72$  мВ. Приготовление наночастиц фукоидан/магнетит осуществляли по методике [16]. Полученные наночастицы трижды промывали и вновь ресуспендировали.

Для иммобилизации в качестве тромболитического агента был выбран тканевой активатор

плазминогена (Actilyse® (rtPA), Германия), являющийся одним из часто используемых в клинической практике фибринолитиков непрямого действия. Фибринолитический фермент включали путем электростатического взаимодействия с поверхностью нанобиокомпозитного материала. Для оценки скорости релиза фермент-содержащий биокомпозитный материал диспергировали в 0,1 М фосфатно-солевом буфере pH 7,4 при 37 °С, подвергали магнитному осаждению, отбирали пробы и ресуспендировали. Отбор проб осуществляли через заданный интервал в течении 320 мин. В образцах определяли количественное содержание фермента по методу Бредфорда.

Расчеты кинетических моделей высвобождения были осуществлены с помощью программного обеспечения KinetDS3.0, а также Microsoft Excel и Excel Solver. В качестве математических моделей были использованы:

1) Кинетическая модель нулевого порядка, рассчитываемая по формуле (1):

$$Mt = k_0 t, \quad (1)$$

где  $k_0$  – константа скорости релиза нулевого порядка;

2) Кинетическая модель первого порядка, рассчитываемая по формуле (2):

$$\lg \frac{M_\infty}{M_\infty - Mt} = k_1 t, \quad (2)$$

где  $k_1$  – константа скорости релиза первого порядка,  $Mt$  – количество фермента, высвободившегося в момент времени  $t$ ,  $M_\infty$  – количество фермента, высвободившегося в результате релиза;

3) Кинетическая модель Корсмейера-Пеппаса, рассчитываемая по формуле [21] (3):

$$Mt = k_m t^n, \quad (3)$$

где  $k_m$  и  $n$  – константы процесса;

4) Кинетическая модель Хигучи, рассчитываемая по формуле [21] (4):

$$Mt = k_h \sqrt{t}, \quad (4)$$

где  $k_h$  – константа растворения Хигучи;

5) Кинетическая модель Бейкера-Лондейла [22] (5):

$$\frac{3}{2} \left( 1 - \left( \frac{Mt}{M_\infty} \right)^{\frac{2}{3}} \right) - \frac{Mt}{M_\infty} = k_b t, \quad (5)$$

где  $k_b$  – константа скорости релиза.

Значение гидродинамического диаметра и электрохимического потенциала образцов определяли методом динамического рассеяния света (ДРС) с помощью анализатора Photocor Compact Z (ООО «Фотокор», Россия). Размер загруженных носителей был также оценен с помощью сканирующего электронного микроскопа Scanning system Tescan Vega 3 (Чехия). Намагниченность готового

композита с иммобилизованным ферментом измерялась в диапазоне приложенного поля 0-4500 кА/м с использованием вибрационного магнитометра Lake Shore Cryotronics VSM 7410-S (LakeShore Cryotronic, США).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В идеале, носитель tPA должен характеризоваться узким распределением частиц по размерам, способствовать пролонгированному высвобождению фермента в рамках терапевтического окна, а также обеспечивать нацеливание на сгусток и предотвращать возможные побочные эффекты. При этом разработанные ранее Кетре Н. с соавторами [2] пегелированные магнитные наночастицы для конъюгации с tPA имели размер от 200 до 365 нм. Функционализация фукоидана наночастицами магнетита позволяет сформировать частицы размером  $94,4 \pm 24,3$  нм [16]. Вероятно, что формирование биокompозитного материала основано на следующих процессах. При смешивании раствора фукоидана и водного золя магнетита осуществляется адсорбция наночастиц  $Fe_3O_4$  на молекулах полисахарида, вследствие большего размера частиц последнего. Известно, что полимеры, содержащие гидроксильные и ионогенные группы кислотного характера могут взаимодействовать с магнетитом посредством лигандного обмена, водородной связи и электростатического взаимодействия [23, 24]. Отрицательное значение дзета-потенциала раствора фукоидана ( $-9,83 \pm 0,16$  мВ) указывает на наличие в структуре депротонированных  $-SO_3H$  групп. Вследствие протонирования гидроксильных групп на поверхности наночастиц  $Fe_3O_4$  [25, 26], электрохимический потенциал золя магнетита составляет  $+28,54 \pm 0,72$  мВ, что подтверждает возможность электростатического взаимодействия наночастиц с полисахаридом. В результате модификации фукоидана наночастицами  $Fe_3O_4$  изменяется величина поверхностной плотности заряда полисахарида, что указывает на взаимодействие фукоидан-магнетит. Полученный биокompозитный материал хорошо диспергируется по двум возможным причинам. Во-первых, благодаря эффекту электростерической стабилизации за счет присутствия полиэлектролита, и, во-вторых, за счет наночастиц магнетита, выступающих как катионный стабилизатор для отрицательно заряженного фукоидана со снижением межфазной энергии посредством комплексообразования [27].

Иммобилизация фибринолитического фермента на носителе осуществлялась за счет электростатического взаимодействия. Тканевой активатор

плазминогена – глобулярный белок с молекулярной массой 72 кДа и электрохимическим потенциалом  $-9,7$  мВ [28]. Максимальная загрузка фермента на носителе Фук@М составила  $9,95 \pm 0,05$  масс.% (398 ед/мг). Количество загруженного фермента определяли методом Бредфорда. Наблюдаемый дзета-потенциал частиц композитного материала после загрузки фермента составил  $-8,68 \pm 0,18$  мВ. 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 [29]. Размер частиц Фук@М, содержащих фермент, был оценен с помощью метода ДРС и составил 264,3 нм. СЭМ-изображение биокompозитного материала с иммобилизованным ферментом представлено на рис. 1.

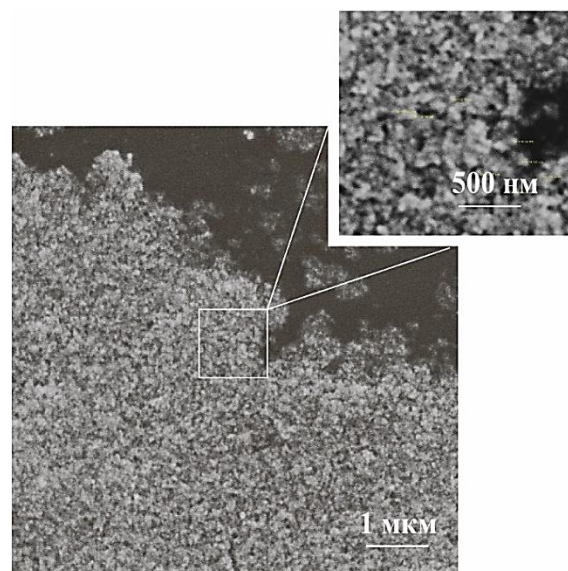


Рис. 1. СЭМ-изображение биокompозитного материала  
Fig. 1. SEM-image of biocomposite material

Известно, что частицы до 320 нм, содержащие tPA, способны проникать в пористую структуру фибриновых сгустков и доставлять фермент внутрь тромба, что позволяет ускорить тромболизис [1, 30].

Исследование высвобождения фермента *in vitro* из наночастиц биокompозитного материала Фук@М в 0,1 М фосфатно-солевом буфере (ФСБ) pH 7,4 при  $37 \pm 0,5$  °C показало наличие берст-эффекта, то есть сильное начальное высвобождение, при котором 54,5% фермента высвобождалось через 40 мин (рис. 1). После этого релиз замедляется, и оставшийся фермент высвобождался в течение следующих 280 мин. Берст-эффект, при использо-

вании полисахаридных носителей, может быть связан с ионным обменом в растворе [31]. Быстрое начальное высвобождение (более 50%) необходимо для лизиса сформированных тромбов, а последующее, более медленное, способствует предотвращению образования в заданном месте новых сгустков [32].

Высвобождение фермента из матрицы, а также структура и свойства получаемых продуктов зависят от ряда факторов, в том числе, от взаимодействия полиэлектролит-белок на которое влияет жесткость полимерной макромолекулярной цепи, природа ионных групп и т.д. [33] Поэтому к полученным экспериментальным данным по высвобождению фибринолитического фермента из нанобиокомпозитного носителя были подобраны наиболее часто применяемые модели аппроксимации, предполагающие, что в основе процесса релиза лежит только диффузия и/или растворение включенного терапевтического агента. При подборе модели могут быть использованы различные критерии, но наиболее распространенным подходом является применение коэффициента корреляции ( $r^2$ ). Поэтому для более точного установления модельного уравнения был использован именно коэффициент  $r^2$ . Результаты обработки экспериментальных данных с помощью математических моделей представлены в таблице.

Из полученных результатов видно, что кинетические модели нулевого и первого порядка имеют низкие значения коэффициента корреляции, поэтому малоприменимы ко всему периоду выпуска фермента. Так для модели нулевого порядка ( $r^2 = 0,75$ ) характерно высвобождение одинакового количества ЛВ в единицу времени [21], в то время как на протяжении всего периода высвобождения наблюдается непостоянная скорость перехода фермента в раствор. Для модели первого порядка ( $r^2 = 0,89$ ) характерно снижение количества высвобождаемого лекарственного вещества в единицу времени [35], что также не соответствует виду получаемой зависимости. Поэтому данные модели можно применить только к некоторым этапам релиза, например, кинетическая модель нулевого порядка применима к начальному этапу релиза (с 0 мин по 40 мин), где уравнение аппроксимации имеет вид  $Mt = 1,66t$ , где  $r^2 = 0,96$ , а кинетическая модель первого порядка – к завершающему этапу высвобождения (с 80 мин по 320 мин), где уравнение аппроксимации имеет вид  $\lg M_{\infty}/(M_{\infty}-Mt) = 0,041t$ , где  $r^2 = 0,93$ .

Также была применена модель экспоненциальной аппроксимации, выражаемая уравнением

Корсмейера-Пеппаса (рис. 2). Это уравнение можно использовать для описания контролируемого высвобождения лекарственного средства из матриц различной геометрии, включая сферические частицы [36].

**Таблица**  
**Кинетические параметры высвобождения фибринолитического фермента из нанобиокомпозитного носителя Фук@М**

**Table. Kinetic parameters of fibrinolytic enzyme release from Fuc@M nanobiocomposite carrier**

Наименование модели	Параметры ( $r^2$ )	Характеристика модели
Кинетическая модель нулевого порядка	0,75	Диффузионный процесс [21]
Кинетическая модель первого порядка	0,89	Высвобождение водорастворимых веществ из пористой матрицы путем диффузии [34]
Модель Корсмейера-Пеппаса (Korsmeyer – Peppas)	0,98	Учитывает диффузию растворителя в матрицу и лекарственного вещества (ЛВ) из матрицы, применима при модифицированном высвобождении [22]
Модель Хигучи (Higuchi)	0,95	Диффузионный процесс по первому закону Фика [21]
Модель Бейкера-Лонсдейла (Baker-Lonsdale)	0,93	Применима к описанию высвобождения из сферических матриц [21]

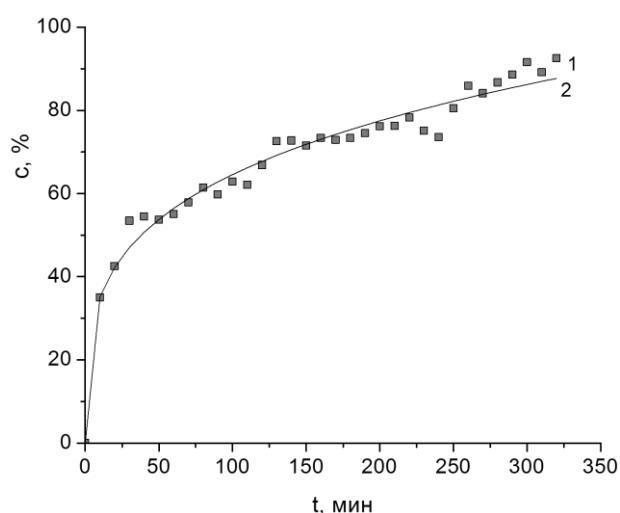


Рис. 2. Применение модели Корсмейера-Пеппаса к релизу фибринолитического фермента, где 1 – экспериментальные данные, 2 – данные аппроксимации ( $Mt=1,92t^{0,26}$ ,  $r^2 = 0,98$ )  
Fig. 2. Application of the Korsmeyer – Peppas model to the release of fibrinolytic enzyme: 1 – experimental data, 2 – approximation data ( $Mt=1,92t^{0,26}$ ,  $r^2 = 0,98$ )

Наблюдаемые данные хорошо соответствуют уравнению Корсмейера-Пеппаса со значением  $n = 0,26$  и  $r^2 = 0,98$ . В этой модели значение  $n$  характеризует механизм высвобождения лекарственного вещества. При значении  $n \leq 0,45$  высвобождение ЛВ соответствует диффузии по закону Фика, при  $0,45 < n < 0,89$  характеризуется нефиковской или аномальной диффузией, при  $n = 0,89$  Case II-транспорт или релаксационный перенос в результате деградации матрицы, при  $n > 0,89$  Super Case II-транспорт [22, 34]. Полученное значение  $n < 0,45$ , что свидетельствует о высвобождении фермента в соответствии с законом диффузии Фика. Постоянная  $k$  характеризует наночастицу, например представляет информацию о его структурных характеристиках [37], также высокое значение  $k$  ( $1,92 \text{ min}^{-1}$ ) указывает на быстрое высвобождение фермента.

Для осуществления манипулирования наночастицами в условиях сопротивления скорости кровотока, контроля их биораспределения и концентрирования в заданном месте [38, 39] необходимо исследовать отклик полученного биокомпозита на градиент магнитного поля и отсутствие остаточной намагниченности для предотвращения тромбоза от магнитно-агрегированных наночастиц [39, 40].

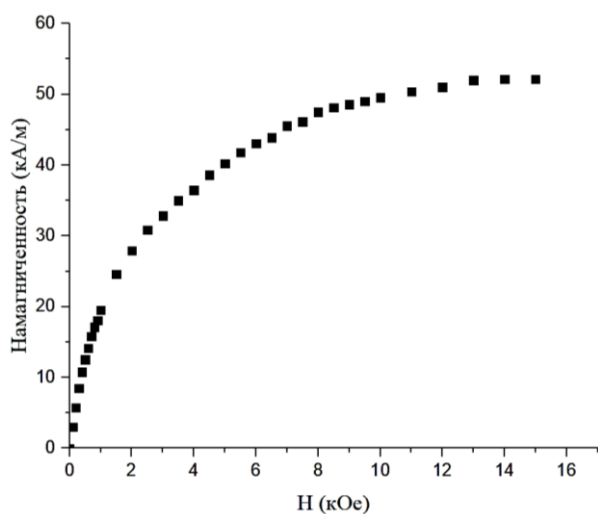


Рис 3. Кривая намагничивания наночастиц Фук@М, содержащих фибринолитический фермент

Fig. 3. Magnetization curve of Fuc@M nanoparticles containing fibrinolytic enzyme

#### ЛИТЕРАТУРА

1. 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. V. 29. N 2 P. 228–237. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.09.027.

Кривые образцов указывают на суперпарамагнитное поведение с отсутствием гистерезиса и остаточной намагниченности (рис. 3). Намагниченность насыщения образца имела значение  $47,7 \pm 1,9 \text{ кА/м}$  при  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , что меньше намагниченности образца золя исходного магнетита ( $M_s \sim 73,8 \pm 3,4 \text{ кА/м}$ ).

Снижение значения намагниченности насыщения часто наблюдается при внедрении наночастиц в немагнитную полимерную матрицу [39], которое увеличивается с ростом содержания  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  в композитах [41]. Поэтому снижение значения намагниченности насыщения может быть связано с наличием оболочки фермент/полисахарид, как немагнитной полимерной матрицы [42], несмотря на больший размер частиц по сравнению с наночастицами магнетита, а также возможными поверхностными эффектами, приводящими к окислению магнетита [34, 35]. Однако этого значения достаточно для их манипулирования в организме [39].

#### ВЫВОДЫ

Таким образом, осуществлена электростатическая иммобилизация фибринолитического фермента с формированием биокомпозитного носителя на основе фукоидана. Средний гидродинамический диаметр и намагниченность насыщения загруженных ферментом частиц нанобиокомпозита составили  $264,3 \text{ нм}$  и  $57,1 \pm 2,3 \text{ кА/м}$ , соответственно. Использование математического моделирования показало, что лучшей моделью для описания кинетики выпуска фермента является уравнение Корсмейера-Пеппаса, где на процесс релиза ферментного препарата оказывает влияние диффузия, подчиняющаяся закону Фика.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность д.х.н В.В. Виноградову за возможность проведения работы на базе лабораторий SCAMT.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

*Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.*

*The author declares the absence a conflict of interest warranting disclosure in this article.*

#### REFERENCES

1. 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. V. 29. N 2 P. 228–237. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.09.027.

2. **Kempe H., Kempe M.** The use of magnetite nanoparticles for implant-assisted magnetic drug targeting in thrombolytic therapy. *Biomaterials*. 2010. V. 31. N 36. P. 9499–9510. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.107.
3. **Liu S., Feng X., Jin R., Li G.** Tissue plasminogen activator-based nanothrombolysis for ischemic stroke. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2017. V 15. N 2. P. 173–184. DOI: 10.1080/17425247.2018.1384464.
4. **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. V. 26. P. 95–109. DOI: 10.1080/1061186X.2017.1365874.
5. **Absar S., Kwon Y. M., Ahsan F.** Bio-responsive delivery of tissue plasminogen activator for localized thrombolysis. *J. Control Release.* 2014. V. 177. N 1. P. 42–50. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.12.036.
6. **Zhao X., Guo F., Hu J., Zhang Xue C., Zhang Z., Li B.** Antithrombotic activity of oral administered low molecular weight fucoidan from *Laminaria Japonica*. *Thromb. Res.* 2016. V. 144. P. 46–52. DOI: 10.1016/j.thromres.2016.03.008.
7. **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. V. 23. N 1. P. 49–56. DOI: 10.1016/j.jfda.2014.05.004.
8. **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. V. 46. N 1. P. 6–12. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2009.10.015.
9. **Irhimeh M.R., Fitton J.H., Lowenthal R.M.** Pilot clinical study to evaluate the anticoagulant activity of fucoidan. *Blood Coagul. Fibrin.* 2009. V. 20. N 7. P. 607–10. DOI: 10.1097/MBC.0b013e32833135fe.
10. **Ruocco N., Costantini S., Guariniello S., Costantini M.** Polysaccharides from the marine environment with pharmacological, cosmeceutical and nutraceutical potential. *Molecules.* V. 21. N 5. 2016. P. 1–16. DOI: 10.3390/molecules21050551.
11. **Wijesekara I., Pangestuti R., Kim S.K.** Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydr. Polym.* 2011. V. 84. N 1. P. 14–21. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.10.062.
12. **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.* 2009. V. 1790. N 2. P. 141–146. DOI: 10.1016/J.BBAGEN.2008.10.008.
13. **Ley K.** The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol. Med.* 2003. V. 9. N 6. P. 263–268. DOI: 10.1016/S1471-4914(03)00071-6.
14. **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.* 2018. V. 156. P. 204–216. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.11.047.
15. **Nardoni M., Della Valle E., Liberti M., Relucenti M., Casadei M.A., Paolicelli P., Apollonio F., Petralito S.** Can pulsed electromagnetic fields trigger on-demand drug release from high-tm magnetoliposomes? *Nanomaterials.* 2018. V. 8. N 4. P. 1–9. DOI: 10.3390/nano8040196.

16. Супрунчук В.Е. Физико-химические свойства наночастиц фукоидан/магнетит, загруженных модельным ферментом. *Вестн. биотехнол. и физ.-хим. биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2022. Т. 18. № 3. С. 35–38.
17. 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. V. 322. N 1–2. P. 32–39. DOI: 10.1016/S0008-6215(99)00206-2.
18. Урванцева А.М., Бакунина И.Ю., Ким Н.Ю., Исаков В., Глазунов В.П., Звягинцева Т.Н. Выделение очищенного фукоидана из природного комплекса с полифенолами и его характеристика. *Химия растит. сырья*. 2004. № 3. P. 15–24.
19. Супрунчук В.Е. Низкочастотная высокоинтенсивная ультразвуковая обработка сульфатированного полисахарида бурых водорослей. *Журн. СВУ. Химия*. 2021. Т. 14. № 4. С. 582–592. DOI: 10.17516/1998-2836-0265.
20. 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.* 2016. V. 468. P. 307–312. DOI: 10.1016/j.jcis.2016.01.061.
21. Филиппова Н.И., Теслев А.А. Применение математического моделирования при оценке высвобождения лекарственных веществ in vitro. *Разраб. и регистр. лекарств. ср-в*. 2017. Т. 4. № 21. С. 218–226.
22. Reddy H., Sambasivarao A. Different kinetic mathematical models used to drug release from solid dosage form. *Int. J. Inf. Res. Rev.* 2017. V. 4. N 12. P. 4845–4850.
23. Lu S., Yuan Z., Zhang C. Binding mechanisms of polysaccharides adsorbing onto magnetite concentrate surface. *Powder Technol.* 2018. V. 340. P. 17–25. DOI: 10.1016/j.powtec.2018.09.021.
24. Zhou Y., Zhang Y., Li G., Wu Y., Jiang T. A further study on adsorption interaction of humic acid on natural magnetite, hematite and quartz in iron ore pelletizing process: Effect of the solution pH value. *Powder Technol.* 2015. V. 271. P. 155–166. DOI: 10.1016/j.powtec.2014.10.045.
25. Rivera L.M.R., Paterno L.G., Chaves N.L., Gregurec D., Bão S.N., Moya S.E., Jain M., Azevedo R.B., Morais P.C., Soler M.A.G. Biocompatible superparamagnetic carriers of chondroitin sulfate. *Mater. Res. Express.* 2019. V. 6. N 6. P. 066106. DOI: 10.1088/2053-1591/ab0950.
26. Bacri J.-C., Perzynski R., Salin D., Cabuil V., Massart R. Ionic ferrofluids: A crossing of chemistry and physics. *J. Magn. Magn. Mater.* 1990. V. 85. N 1–3. P. 27–32. DOI: 10.1016/0304-8853(90)90010-N.
27. Mauricio M.R., Guilherme M.R., Kunita M.H., Muniz E.C., Rubira A.F. Designing nanostructured microspheres with well-defined outlines by mixing carboxyl-functionalized amylose and magnetite via ultrasound. *J. Chem. Eng.* 2012. V. 189–190. P. 456–463. DOI: 10.1016/j.cej.2012.02.044.
28. 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.* 2010. V. 147. N 2. P. 269–277. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.07.127.
29. 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 a Plications. *J. Colloid Interface Sci.* 2014. V. 436. P. 234–242. DOI: 10.1016/j.jcis.2014.08.064.
30. Wolberg A.S. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Rev.* 2007. V. 21. N 3. P. 131–142. DOI: 10.1016/j.blre.2006.11.001.
16. Suprunchuk V.E. Physicochemical properties of fucoïdan/magnetite nanoparticles loaded with a model enzyme. *Vestn. Biotekhnol. Fiz.-Khim. Biol. im. Yu.A. Ovchinnikov*. 2022. V. 18. N 3. P. 35–38 (in Russian).
17. 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. V. 322. N 1–2. P. 32–39. DOI: 10.1016/S0008-6215(99)00206-2.
18. Urvantseva A.M., Bakunina I.Yu., Kim N.Yu., Isakov V., Glazunov V.P., Zvyagintseva T.N. Isolation of purified fucoïdan from a natural complex with polyphenols and its characterization. *Khim. Rastitel. Syr'ya*. 2004. N 3. P. 15–24 (in Russian).
19. Suprunchuk V.E. Low frequency high intensity sonication of sulfated brown algae polysaccharide. *J. Sib. Fed. Univ.: Chem.* 2021. V. 14. N 4. С. 582–592 (in Russian). DOI: 10.17516/1998-2836-0265.
20. 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.* 2016. V. 468. P. 307–312. DOI: 10.1016/j.jcis.2016.01.061.
21. Filippova N.I., Teslev A.A. Application of mathematical modeling in the evaluation of the release of drugs in vitro. *Razrab. Registr. Lekarstv. Sr-v*. 2017. V. 4. N 21. P. 218–226 (in Russian).
22. Reddy H., Sambasivarao A. Different kinetic mathematical models used to drug release from solid dosage form. *Int. J. Inf. Res. Rev.* 2017. V. 4. N 12. P. 4845–4850.
23. Lu S., Yuan Z., Zhang C. Binding mechanisms of polysaccharides adsorbing onto magnetite concentrate surface. *Powder Technol.* 2018. V. 340. P. 17–25. DOI: 10.1016/j.powtec.2018.09.021.
24. Zhou Y., Zhang Y., Li G., Wu Y., Jiang T. A further study on adsorption interaction of humic acid on natural magnetite, hematite and quartz in iron ore pelletizing process: Effect of the solution pH value. *Powder Technol.* 2015. V. 271. P. 155–166. DOI: 10.1016/j.powtec.2014.10.045.
25. Rivera L.M.R., Paterno L.G., Chaves N.L., Gregurec D., Bão S.N., Moya S.E., Jain M., Azevedo R.B., Morais P.C., Soler M.A.G. Biocompatible superparamagnetic carriers of chondroitin sulfate. *Mater. Res. Express.* 2019. V. 6. N 6. P. 066106. DOI: 10.1088/2053-1591/ab0950.
26. Bacri J.-C., Perzynski R., Salin D., Cabuil V., Massart R. Ionic ferrofluids: A crossing of chemistry and physics. *J. Magn. Magn. Mater.* 1990. V. 85. N 1–3. P. 27–32. DOI: 10.1016/0304-8853(90)90010-N.
27. Mauricio M.R., Guilherme M.R., Kunita M.H., Muniz E.C., Rubira A.F. Designing nanostructured microspheres with well-defined outlines by mixing carboxyl-functionalized amylose and magnetite via ultrasound. *J. Chem. Eng.* 2012. V. 189–190. P. 456–463. DOI: 10.1016/j.cej.2012.02.044.
28. 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.* 2010. V. 147. N 2. P. 269–277. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.07.127.
29. 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 a Plications. *J. Colloid Interface Sci.* 2014. V. 436. P. 234–242. DOI: 10.1016/j.jcis.2014.08.064.
30. Wolberg A.S. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Rev.* 2007. V. 21. N 3. P. 131–142. DOI: 10.1016/j.blre.2006.11.001.



31. **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*. 2016. V. 4. N 15. P. 2578–2590. DOI: 10.1039/c5tb02579f.
32. **Kim J., Kim J., Park J., Byun Y., Kim C.** The use of PEGylated liposomes to prolong circulation lifetimes of tissue plasminogen activator. *Biomaterials*. 2009. V. 30. N 29. P. 5751–5756. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.07.021.
33. **Смирнова Н.Н., Смирнов К.В.** Взаимодействие природных и синтетических полиэлектролитов с бычьим сывороточным альбумином. *Изв. вузов. Химия и хим. технология*. 2019. Т. 62. Вып. 7. С. 45–51. DOI: 10.6060/ivkkt.20196207.5839.
34. **Dash S., Murthy P.N., Lilakanta N., Chowdhury P.** Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol. Pharm. Drug Res*. 2010. V. 67. N 3. P. 217–223.
35. **Альрухане Р., Шешко Т.Ф., Маркова Е.Б., Болдырев С., Разводова А.А., Чередниченко А.Г.** Исследование кинетики растворения твердой дисперсии мекенаминовой кислоты с поливинилпирролидоном. *Вестн. МГТУ им. НЭ Баумана. Сер. Естеств. науки*. 2021. Т. 6. № 99. С. 79–95. DOI: 10.18698/1812-3368-2021-6-79-95.
36. **Dutta R.K., Sahu S., Reddy V.R.** Synthesis, characterization, and in vitro release of diclofenac sodium from hybrid nanostructured magnetite-calcium pectinate. *J. Nanopart. Res*. 2012. V. 14. N 8. P. 1052. DOI: 10.1007/s11051-012-1052-9.
37. **Wu I.Y., Bala S., Škalko-Basnet N., di Cagno M.P.** Interpreting non-linear drug diffusion data: Utilizing Korsmeyer-Peppas model to study drug release from liposomes. *Eur. J. Pharm. Sci*. 2019. V. 138, P. 105026. DOI: 10.1016/j.ejps.2019.105026.
38. **Ali A., Ahmed S.** A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol*. 2018. V. 109. P. 273–286. DOI: 10.1016/j.ijbiomac. 2017.12.078.
39. **Shagholani H., Ghoreishi S.M., Mousazadeh M.** Improvement of interaction between PVA and chitosan via magnetite nanoparticles for drug delivery application. *Int. J. Biol. Macromol*. 2015. V. 78. P. 130–136. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.02.042.
40. **Allard-Vannier E., Cohen-Jonathan S., Gautier J., Hervé-Aubert K., Munnier E., Soucé M., Legras P., Passirani C., Chourpa I.** Pegylated magnetic nanocarriers for doxorubicin delivery: A quantitative determination of stealthiness in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 2012. V. 81. N 3. P. 498–505. DOI: 10.1016/j.ejpb.2012.04.002.
41. **Franklin A.D., Berkowitz A.E.** The Approach to Saturation in Dilute Ferromagnetics. *Phys. Rev*. 1953. V. 89. N 6. P. 1171–1171. DOI: 10.1103/PhysRev.89.1171.
42. **Bhatt A.S., Krishna Bhat D., Santosh M.S.** Electrical and magnetic properties of chitosan-magnetite nanocomposites. *Physica B: Phys. Condens. Matter*. 2010. V. 405. N 8. P. 2078–2082. DOI: 10.1016/j.physb.2010.01.106.
43. **Gee S.H., Hong Y.K., Erickson D.W., Park M.H., Sur J.C.** Synthesis and aging effect of spherical magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles for biosensor applications. *J. Appl. Phys*. 2003. V. 93. N 10. P. 7560–7562. DOI: 10.1063/1.1540177.
44. **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 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles coated with fucan polysaccharides. *J. Magn. Magn. Mater*. 2013. V. 343. P. 138–143. DOI: 10.1016/j.jmmm.2013.04.062.
31. **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*. 2016. V. 4. N 15. P. 2578–2590. DOI: 10.1039/c5tb02579f.
32. **Kim J., Kim J., Park J., Byun Y., Kim C.** The use of PEGylated liposomes to prolong circulation lifetimes of tissue plasminogen activator. *Biomaterials*. 2009. V. 30. N 29. P. 5751–5756. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.07.021.
33. **Smirnova N.N., Smirnov K.V.** Interaction of natural and synthetic polyelectrolytes with bovine serum albumin. *Chem-ChemTech [Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.]*. 2019. V. 62. N 7. P. 45–51. DOI: 10.6060/ivkkt.20196207.5839.
34. **Dash S., Murthy P.N., Lilakanta N., Chowdhury P.** Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol. Pharm. Drug Res*. 2010. V. 67. N 3. P. 217–223.
35. **Alruhaie R., Sheshko T.F., Markova E.B., Boldirev S., Razvodova A.A., Cherednichenko A.G.** Study of the dissolution kinetics of a solid dispersion of mefenamic acid with polyvinylpyrrolidone. *Vestn. MGPU. Ser.: Estestv. Nauki*. 2021. V. 6. N 99. P. 79–95 (in Russian). DOI: 10.18698/1812-3368-2021-6-79-95.
36. **Dutta R.K., Sahu S., Reddy V.R.** Synthesis, characterization, and in vitro release of diclofenac sodium from hybrid nanostructured magnetite-calcium pectinate. *J. Nanopart. Res*. 2012. V. 14. N 8. P. 1052. DOI: 10.1007/s11051-012-1052-9.
37. **Wu I.Y., Bala S., Škalko-Basnet N., di Cagno M.P.** Interpreting non-linear drug diffusion data: Utilizing Korsmeyer-Peppas model to study drug release from liposomes. *Eur. J. Pharm. Sci*. 2019. V. 138. P. 105026. DOI: 10.1016/j.ejps.2019.105026.
38. **Ali A., Ahmed S.** A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol*. 2018. V. 109. P. 273–286. DOI: 10.1016/j.ijbiomac. 2017.12.078.
39. **Shagholani H., Ghoreishi S.M., Mousazadeh M.** Improvement of interaction between PVA and chitosan via magnetite nanoparticles for drug delivery application. *Int. J. Biol. Macromol*. 2015. V. 78. P. 130–136. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.02.042.
40. **Allard-Vannier E., Cohen-Jonathan S., Gautier J., Hervé-Aubert K., Munnier E., Soucé M., Legras P., Passirani C., Chourpa I.** Pegylated magnetic nanocarriers for doxorubicin delivery: A quantitative determination of stealthiness in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 2012. V. 81. N 3. P. 498–505. DOI: 10.1016/j.ejpb.2012.04.002.
41. **Franklin A.D., Berkowitz A.E.** The Approach to Saturation in Dilute Ferromagnetics. *Phys. Rev*. 1953. V. 89. N 6. P. 1171–1171. DOI: 10.1103/PhysRev.89.1171.
42. **Bhatt A.S., Krishna Bhat D., Santosh M.S.** Electrical and magnetic properties of chitosan-magnetite nanocomposites. *Physica B: Phys. Condens. Matter*. 2010. V. 405. N 8. P. 2078–2082. DOI: 10.1016/j.physb.2010.01.106.
43. **Gee S.H., Hong Y.K., Erickson D.W., Park M.H., Sur J.C.** Synthesis and aging effect of spherical magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles for biosensor applications. *J. Appl. Phys*. 2003. V. 93. N 10. P. 7560–7562. DOI: 10.1063/1.1540177.
44. **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 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles coated with fucan polysaccharides. *J. Magn. Magn. Mater*. 2013. V. 343. P. 138–143. DOI: 10.1016/j.jmmm.2013.04.062.

Поступила в редакцию (Received) 30.05.2022

Принята к опубликованию (Accepted) 23.01.2023