

ПОЛИМЕРНЫЕ, БИООРГАНИЧЕСКИЕ  
И ГИБРИДНЫЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ

УДК 544.77.022; 547.022; 549.31

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЗОЛОТОСОДЕРЖАЩЕГО  
НАНОКОМПОЗИТА НА ОСНОВЕ СУЛЬФАТИРОВАННОГО  
ПОЛИСАХАРИДА КАРРАГИНАНА

© 2023 г. М. В. Зверева<sup>1,\*</sup>, Г. П. Александрова<sup>1</sup>, Т. В. Фадеева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, Иркутск, Россия

<sup>2</sup>Иркутский научный центр хирургии и травматологии, Иркутск, Россия

\*E-mail: mlesnichaya@mail.ru

Поступила в редакцию 08.12.2022 г.

После доработки 27.01.2023 г.

Принята к публикации 14.02.2023 г.

Представлены результаты синтеза биологически активной наноструктурированной полимерной системы на основе природного полисахарида κ-каррагинана, выступающего одновременно в качестве восстанавливающего и стабилизирующего агента для формирующихся наночастиц золота. Строение и наноморфологические характеристики полученного наноконкомпозита (в частности, в водном растворе), представляющего собой κ-каррагинан стабилизированные наночастицы Au<sup>0</sup>, размер которых варьирует в интервале 6–20 нм, установлены посредством современных спектральных (ИК- и оптическая спектроскопия, динамические рассеяние света) и микроскопических (просвечивающая электронная микроскопия) методов исследования. Впервые установлено, что наноконкомпозит Au<sup>0</sup>НЧ/κ-КГ-ДП обладает выраженной антикоагулянтной активностью, влияя на внутренний и внешний путь свертывания крови.

DOI: 10.56304/S199272232306016X

ВВЕДЕНИЕ

В течение многих десятилетий наночастицы благодаря своим уникальным размер-зависимым свойствам получают все большее распространение в различных областях науки и техники, в частности наиболее интенсивно в биологии и медицине, в том числе в сельском хозяйстве [1–3]. Одними из наиболее изученных нанообъектов являются наночастицы золота (Au<sup>0</sup>НЧ) и гибридные органо-неорганические наноконкомпозиты на их основе. Au<sup>0</sup>НЧ обладают выраженной антимикробной [4], антималярийной [5], иммуномодулирующей [6] активностью, используются в терапии злокачественных новообразований [7], а также в качестве адъювантов [8] и доставщиков антигенов [9]. Возможные области практического использования Au<sup>0</sup>НЧ постоянно расширяются, что обуславливает необходимость детализированного исследования потенциальных механизмов их влияния на организм. Известно, что в случае попадания наночастиц в кровообращение они неизбежно взаимодействуют с клетками крови, белками и эндотелиальными клетками, а также ключевыми компонентами свертывающей системы крови, такими как тромбоциты и плазменные факторы свертывания, определяя коагуляционно-опосредованную токсичность [10]. Однако каких-либо одно-

значных выводов о влиянии Au<sup>0</sup>НЧ на систему свертывания крови в настоящее время нет. Согласно [11] цитрат-стабилизированные Au<sup>0</sup>НЧ размером 60 нм не усиливали агонист-индуцированную активацию тромбоцитов. Тогда как другие исследования показали, что Au<sup>0</sup>НЧ-усиленная активация тромбоцитов является размер-зависимой, в частности небольшие наночастицы (в сочетании с индукторами коагуляции) вызывали более жесткую активацию тромбоцитов по сравнению с наночастицами больших размеров [12, 13].

Вследствие того что Au<sup>0</sup>НЧ являются одними из наиболее изученных нанообъектов и обладают комплексом выраженных биологических свойств, обуславливающих перспективность их применения в биомедицинских приложениях, вопрос их токсичности остается открытым и требует детального изучения на примере конкретных биологических тест-систем. Поскольку биологическая активность Au<sup>0</sup>НЧ (в том числе токсичность) определяется их размером, формой, лигандным окружением и способом получения, весьма перспективным является использование для синтеза наночастиц природных нетоксичных соединений (растительные экстракты [14], полисахариды [15]), выполняющих одновременно функции восстановителя и стабилизатора Au<sup>0</sup>НЧ. В частно-

сти, в [16] получены и охарактеризованы нанокомпозиты золота на основе  $\kappa$ -каррагинана (**к-КГ**) – природного сульфатированного полисахарида красных морских водорослей. При этом полученные нанокомпозиты характеризуются как свойствами стабилизирующей полисахаридной матрицы (водорастворимость, гелеобразующие свойства, биологическая активность), так и физико-химическими свойствами  $\text{Au}^0\text{НЧ}$ .

В настоящей работе представлены результаты синтеза и исследования влияния на свертывающую систему крови агрегативно устойчивого водорастворимого  $\text{Au}^0\text{НЧ}$ -содержащего нанокомпозита, представляющего собой  $\kappa$ -КГ-стабилизированные  $\text{Au}^0\text{НЧ}$  со средним размером 10.4 нм.

## МЕТОДЫ

**Материалы.** В работе использовали  $\kappa$ -каррагинан марки WR-78 CP Celko, Дания. Элементный анализ, %: С – 34.7, Н – 5.9, S – 6.9, Na – 0.96, К – 6.3. Этанол (Реахим),  $\text{HAuCl}_4$  (Sigma-Aldrich), NaOH (Реахим) были использованы без дополнительной очистки.

**Методы исследования.** Микрофотографии  $\text{Au}^0\text{НЧ}$  в полисахаридной матрице  $\kappa$ -КГ получали на просвечивающем электронном микроскопе “Leo 906 E” с использованием медных сеток с формваровым слоем в качестве подложки. Подготовку пробы анализируемого композита осуществляли в соответствии с описанной в [17] методикой. Измерение размера частиц выполняли в ручном режиме с использованием программы IP-Win45. Статистически-значимая выборка наночастиц и надежность их полученного итогового размерного распределения обеспечивалась обработкой не менее 7–10 микрофотографий разных полей анализируемой подложки для получения данных о размере 900–1000 частиц.

Элементный состав нанокомпозита получен на сканирующем электронном микроскопе Hitachi TM 3000, оснащенный с X-ray детектором SDD XFlash 430-4, посредством рентгеновского энергодисперсионного микроанализа и на CHNS-анализаторе Flash 2000 фирмы Thermo Scientific.

Молекулярно-массовые характеристики деполимеризованного  $\kappa$ -КГ-ДП (используемого для синтеза нанокомпозита) и  $\kappa$ -каррагинана в составе синтезированного нанокомпозита  $\text{Au}^0\text{НЧ}/\kappa$ -КГ-ДП определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (**ВЭЖХ**) на хроматографе Agilent 1100/1260 с использованием колонок Ultrahydrogel Linear (Waters, США). В качестве элюента использовали водный 0.1 н раствор нитрата натрия. Детекторами служили дифференциальный рефрактометр (RID10A, Shimadzu), установка многоугольного рассеяния света (Mini DAWN TriStar, Wyatt Technology Corporation,

США) и спектрофотометрический детектор. Для калибровки колонки в качестве полимерных стандартов использовали узкодисперсные полиэтиленоксиды и пуллуланы PSS (Германия). Обработка результатов ВЭЖХ-анализа проведена с помощью компьютерной программы Astra. Детальное описание методики пробоподготовки образцов полисахарида и нанокомпозита на его основе, а также алгоритм проведения исследования и обработки результатов представлены в [18].

Гидродинамические радиусы ( $R_h$ )  $\kappa$ -КГ-ДП и его нанокомпозита  $\text{Au}^0\text{НЧ}/\kappa$ -КГ-ДП (2.9% Au) определяли методом динамического рассеяния света (ДРС) на корреляционном спектрометре Photocor Compact-Z (источник света – термостабилизированный полупроводниковый лазер мощностью 20 мВт с длиной волны  $\lambda = 638$  нм) под углом  $90^\circ$ . Анализ корреляционной функции осуществляли с помощью программы обработки данных ДРС Dynals. Растворы для анализа готовили растворением при комнатной температуре в течение семи часов 5 мг образца в 5 мл дистиллированной воды, предварительно отфильтрованной через шприцевой фильтр. Время каждого измерения составляло не менее 200 с. Измерение проводили в трехкратной повторности.

Электрофоретическую подвижность наночастиц также измеряли на спектрометре Photocor Compact-Z с использованием протокола PALS (Phase analysis light scattering). Преобразование полученного значения электрофоретической подвижности  $\mu E = v/E$  в  $\zeta$ -потенциал было проведено по уравнению Смолуховского  $\mu E = \epsilon\epsilon_0\zeta/\eta_s$ , где  $\epsilon$  и  $\epsilon_0$  – диэлектрическая проницаемость растворителя и вакуума соответственно. Каждое измерение проводили в трехкратной повторности, результаты усредняли.

ИК-спектры регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре (RAM II) Bruker Vertex 70 в таблетках KBr в диапазоне  $4000$ – $400$   $\text{см}^{-1}$ . Спектры ЯМР  $^{13}\text{C}$  в  $\text{D}_2\text{O}$  (концентрация составляла 2%) с добавлением CuAc в качестве релаксанта были измерены на “Bruker DPX-400”, работающем на частоте 100.13 МГц при  $27^\circ\text{C}$ . Химические сдвиги всех атомов углерода приведены относительно внутреннего стандарта DSS ( $d = 0.000$  ppm).

ИК-спектр  $\kappa$ -КГ-ДП ( $\text{см}^{-1}$ ): 3449 ( $\nu$  O–H), 2963, 2823 ( $\nu$  C–H), 1640, ( $\nu$  O–H), 1255, 1381 (сложноэфирная сульфатная группа), 934 (3,6-ангидрогалактоза – DA), 847 (галактоза-4-сульфат – G4S).

$^{13}\text{C}$  ЯМР  $\kappa$ -КГ-ДП ( $\delta$  ppm): 104.7 (C-1 G4S), 97.0 (C-1 DA), 71.7 (C-2 G4S), 80.7 (C-3 G4S), 81.5 (C-3 DA), 76.0 (C-4 G4S), 80.6 (C-4 DA), 77.0 (C-5 G4S), 78.9 (C-5 DA), 63.5 (C-6 G4S).

Спектры оптического поглощения 0.1%-ного водного раствора нанокомпозита регистрировали

на спектрофотометре Perkin Elmer Lambda 35 относительно дистиллированной воды в кварцевой кювете объемом 1 см<sup>3</sup> в интервале длин волн 190–1000 нм.

**Методика щелочной деполимеризации к-КГ.** Щелочную деполимеризацию к-КГ осуществляли согласно протоколу, подробно представленному в [19], с незначительными изменениями. Кратко: к 170 мл 2.8%-ного водного раствора к-КГ приливали 75 мл 1 N водного раствора NaOH. Смесь нагревали на водяной бане при температуре 85–90°C в течение 180 мин при интенсивном перемешивании на верхнеприводном перемешивающем устройстве ЭКРОС-8300 (Россия). По истечении указанного времени в реакционную смесь добавили 1 M водный раствор HCl до pH 6.0–7.0 с последующим высаживанием реакционной смеси в четырехкратный избыток EtOH. Полученный осадок отфильтровывали, промывали этанолом и высушивали на воздухе. Выход деполимеризованного полисахарида (к-КГ-ДП) составил 84%. Элементный анализ, %: С – 33.1, Н – 6.1, S – 6.8, Na – 3.36, K – 3.6.

**Методика синтеза наноконкомпозита Au<sup>0</sup>НЧ/к-КГ-ДП (2.9% Au<sup>0</sup>).** Синтез наноконкомпозита осуществляли согласно протоколу, подробно описанному в [16], с незначительными изменениями. Кратко: к 50 мл 1.7%-ного водного раствора к-КГ-ДП при температуре 35°C и интенсивном перемешивании добавили 5 мл водного раствора, содержащего 1.36 ммоль HAuCl<sub>4</sub>. Смесь выдержали при температуре 35°C в течение 30 мин, после чего увеличили pH среды до 10.42 добавлением 1 N водного раствора NaOH и последующим повышением температуры реакционной среды до 70°C на водяной бане. Время синтеза – 25 мин. Выделение целевого наноконкомпозита и очистку его от примесей проводили путем осаждения реакционной среды в четырехкратный избыток EtOH и многократной промывки сформированного осадка фиолетового цвета этанолом с последующей сушкой на воздухе при комнатной температуре. Количественное содержание золота в полученном образце 2.9%. Элементный анализ, %: С – 32.6, Н – 5.8, Au – 2.9, S – 6.3, Na – 3.0, K – 3.1.

**Определение антикоагулянтной активности.** Антикоагулянтную активность исходного к-КГ, его деполимеризованного производного к-КГ-ДП и наноконкомпозита Au<sup>0</sup>НЧ/к-КГ-ДП (2.9% Au<sup>0</sup>) исследовали *in vitro* по стандартным методикам определения коагуляционных показателей: АПТВ (активированное парциальное тромбопластиновое время) и ТВ (тромбиновое время) с использованием донорской крови человека. Для определения АПТВ смешивали раствор цитратной плазмы с тестируемыми образцами потенциальных антикоагулянтов с концентрацией 0.013, 0.025, 0.032% и выдерживали в течение 3 мин при 37°C. Далее

добавляли 0.1 мл АПТВ – реагента, нагретого до 37°C, и инкубировали полученную смесь в течение 5 мин при 37°C. После этого добавляли 0.1 мл CaCl<sub>2</sub> (0.025 моль/л) и фиксировали время свертывания. Для анализа ТВ цитратную нормальную плазму смешивали с растворами тестируемых образцов потенциальных антикоагулянтов и выдерживали в течение 3 мин при 37°C, после чего добавляли экзогенный тромбин и фиксировали время свертывания. Эксперимент выполнен в 15 повторностях.

## ОБСУЖДЕНИЕ

к-КГ представляет собой водорастворимый сульфатированный полисахарид, макромолекулы которого состоят из регулярно чередующихся остатков 3-*O*-замещенной β-*D*-галактопиранозы с заместителем в виде сульфогруппы в положении 4 и 4-*O*-замещенной 3,6-ангидро-α-*D*-галактопиранозы. Степень сульфатирования при этом составляет ~6%, что соответствует приблизительно наличию одной сульфогруппы на дисахаридное звено макромолекулы к-КГ [16] (рис. 1).

В целях увеличения водорастворимости посредством оптимизации молекулярно-массовых характеристик исходного к-КГ в [18] была проведена его частичная щелочная деполимеризация, в результате которой получены образцы деполимеризованного каррагинана (к-КГ-ДП) с  $M_w$  1010 кДа,  $M_n$  565 кДа, довольно широким молекулярно-массовым распределением и полидисперсностью 1.79, используемые в дальнейшем для синтеза наноконкомпозита. Синтез Au<sup>0</sup>-содержащего наноконкомпозита осуществляли в водной среде в соответствии с разработанной ранее методикой, в основе которой лежит использование природных полисахаридов (арабиногалактана, галактоманнана и к-КГ) одновременно в качестве как восстановителя ионов металла (в частности Au<sup>+3</sup>) до нуль-валентного состояния, так и стабилизатора формирующихся наночастиц [20]. Сам синтез при этом запускается сдвигом pH реакционной среды в щелочную область с параллельным нагревом до 70°C реакционной среды. Полисахарид в наноконкомпозите Au<sup>0</sup>НЧ/к-КГ-ДП вследствие деструкционных процессов имеет молекулярную массу  $M_w$  129 кДа и  $M_n$  96 кДа и становится более узкодисперсным (1.35), чем взятый для синтеза исходный к-КГ-ДП. Следует предположить, что к-каррагинан достаточно легко подвергается деструкционному процессу щелочной деполимеризации вследствие наличия β-(1→4)-гликозидных связей и регулярного линейного строения [20]. При этом необходимость избытка гидроксид-анионов в реакционной среде для запуска синтеза наноконкомпозита, вероятно, обусловлена их непосредственным участием в генерации дополнительных восстанов-

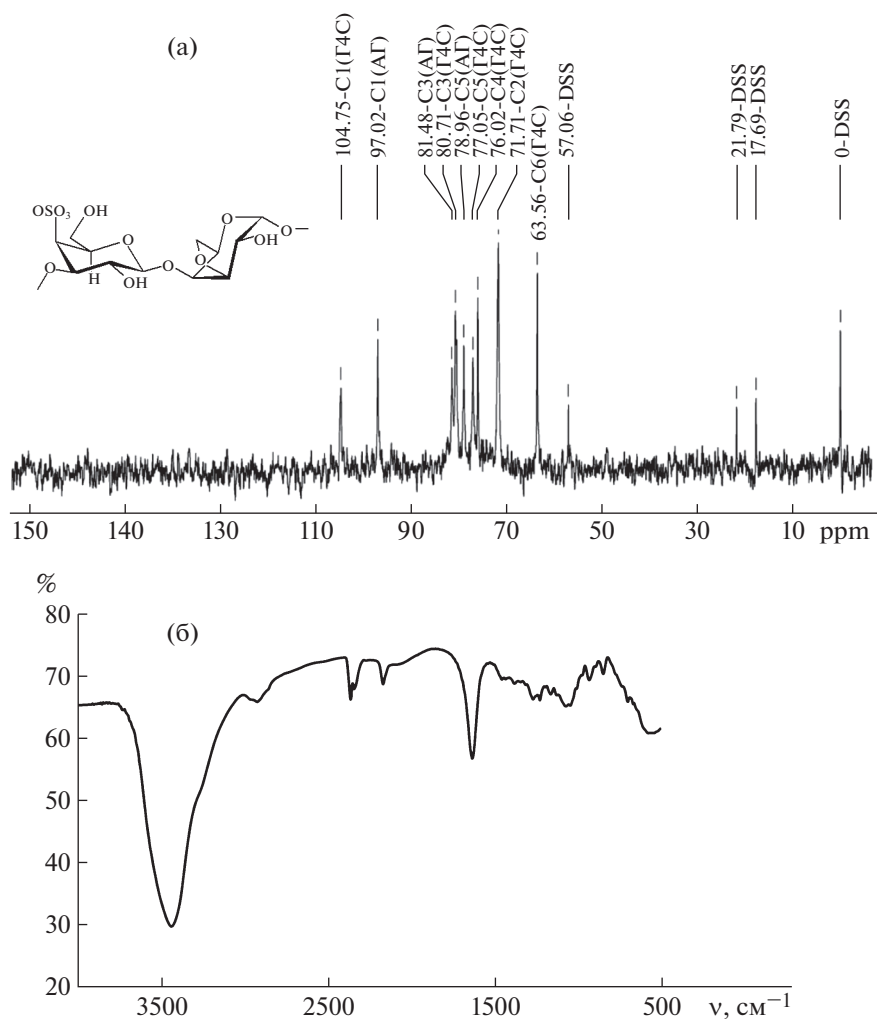


Рис. 1.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр (а) и ИК-спектр (б) полисахарида к-КГ-ДП.

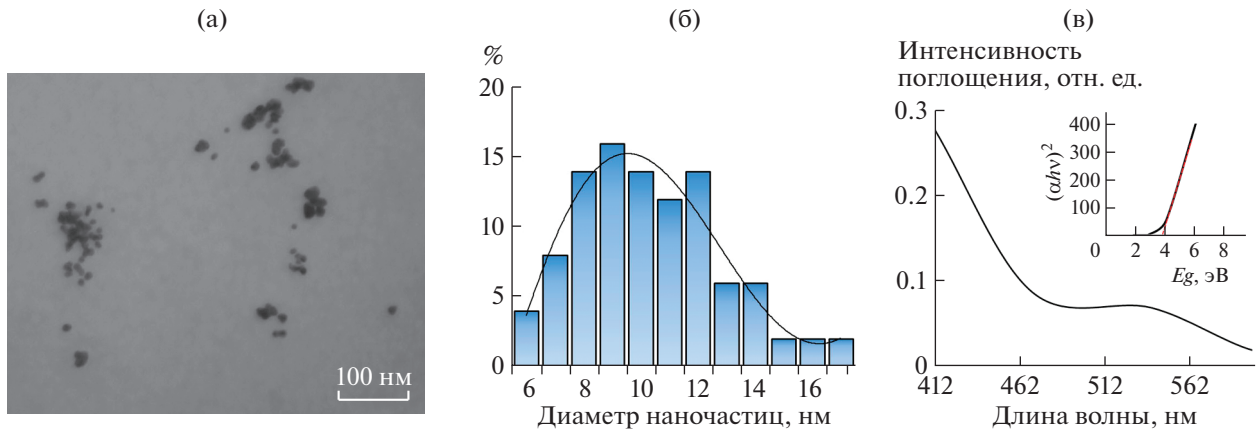
ливающих фрагментов в результате параллельного протекания в реакционной среде при повышенной температуре реакции щелочного пилинга полисахарида с образованием молекул восстанавливающих моносахаров. Кроме того, весьма вероятно, что гидроксид-анионы участвуют в связывании протонов, выделяющихся в результате окислительно-восстановительной реакции [16, 20, 21]. Результатом данного одностадийного синтеза является получение нанокompозита  $\text{Au}^0\text{НЧ}/\text{к-КГ-ДП}$ , представляющего собой наночастицы нульвалентного золота (в количестве 2.9% от массы всего композита), стабилизированные полисахаридной матрицей к-КГ-ДП.

Согласно данным просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) нанокompозит  $\text{Au}^0\text{НЧ}/\text{к-КГ-ДП}$  формируется в виде распределенных в полисахаридной матрице к-КГ-ДП-частиц с формой, приближенной к сферической (рис. 2а). Размер наночастиц при этом варьирует в интервале 6–20 нм (рис. 2б) со средним значе-

нием 10.4 нм. Приближенность формы наночастиц к сферической, вероятно, обусловлена стремлением к самопроизвольному снижению поверхностной энергии формирующихся частиц и отсутствием в реакционной среде условий для их анизотропного роста [22, 23].

Спектр поглощения 0.1%-ного водного раствора полученного нанокompозита  $\text{Au}^0\text{НЧ}/\text{к-КГ-ДП}$  характеризуется наличием одного интенсивного максимума плазмонного поглощения в области 540 нм, обусловленного коллективными колебаниями электронов проводимости наночастиц золота, свидетельствуя о сферической форме и нуль-валентном характере присутствующих в составе нанокompозита частиц золота (рис. 2в).

Исследование водного раствора к-КГ-ДП методом ДРС позволило установить, что этот коллоид в распределении интенсивности рассеяния характеризуется наличием одной фракции достаточно крупных ( $R_h$  56–112 нм) частиц (рис. 3а). При этом переход к числовому распределению  $R_h$

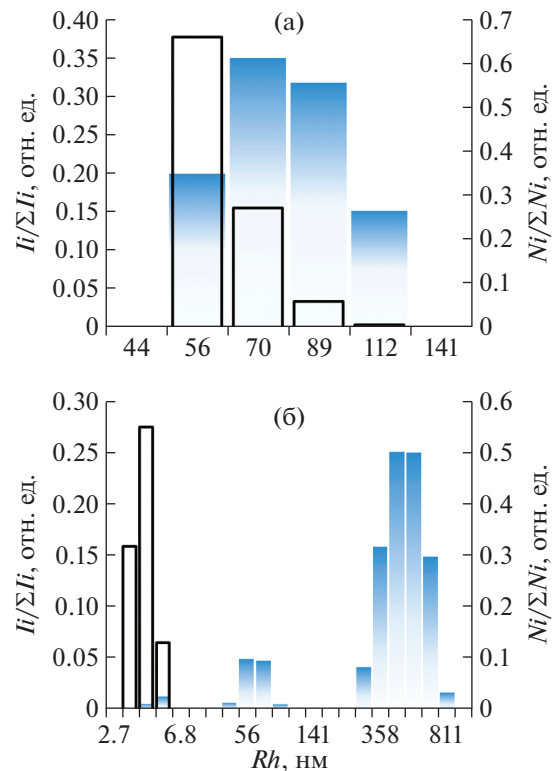


**Рис. 2.** Микрофотография (а) и распределение дисперсности наночастиц в композите Au<sup>0</sup>НЧ/к-КГ-ДП (2.9% Au) (б). Спектр поглощения 0.1%-ного водного раствора нанокompозита Au<sup>0</sup>НЧ/к-КГ-ДП (2.9% Au) (в). На вставке представлена спектральная зависимость его коэффициента поглощения в координатах Таус.

частиц сопровождается сохранением мономодального характера распределения *Rh* в образце к-КГ-ДП. Известно, что насыщенность макромолекул полисахаридов (в том числе, к-КГ) гидроксильными группами способствует вовлечению их в образование водородных связей, а также их участию в ван-дер-ваальсовых взаимодействиях даже в хороших растворителях, что неизбежно приводит к образованию прочных ассоциатов и метастабильных агрегатов [24]. В данном случае присутствие в водном растворе к-КГ-ДП достаточно крупных частиц со средним значением *Rh* 70 нм, вероятно, обусловлено агрегационными процессами между его макромолекулами в растворе [25]. Отметим, что характер распределения *Rh* частиц в полученном нанокompозите Au<sup>0</sup>НЧ/к-КГ-ДП (2.9% Au) кардинальным образом отличается от исходного к-КГ-ДП, свидетельствуя о преобразовании макромолекул каррагинана в процессе синтеза нанокompозита. Так, исследование водных растворов полученного нанокompозита Au<sup>0</sup>НЧ/к-КГ-ДП (2.9% Au) методом ДРС позволило установить, что этот коллоид в распределении интенсивности рассеяния частиц характеризуется наличием трех фракций (рис. 3б).

Предположительно, первая быстрая фракция частиц с *Rh* 4.3–5.4 нм соответствует либо индивидуальным наночастицам золота небольшого размера (6 нм согласно ПЭМ), стабилизированным слоем макромолекул к-КГ-ДП, либо индивидуальным макромолекулам к-каррагинана. Однако отсутствие быстрой фракции частиц с данным диапазоном *Rh* в распределении, полученном от исходного полисахарида к-КГ-ДП, не позволяет в полной мере утверждать о принадлежности быстрой фракции частиц, выделенной в образце нанокompозита, исключительно макромолекулам полисахарида. Фракция частиц со значением

*Rh* 44–89 нм, в свою очередь, может соответствовать либо более крупным наночастицам золота (8–20 нм по данным ПЭМ в режиме темного поля), стабилизированным несколькими слоями полисахарида, либо небольшим ассоциатам полисахарид-стабилизированных наночастиц Au<sup>0</sup>



**Рис. 3.** Распределение значений интенсивности и числовое распределение *Rh* частиц в образцах исходного полисахарида к-КГ-ДП (а) и нанокompозита Au<sup>0</sup>НЧ/к-КГ-ДП (2.9% Au) (б).

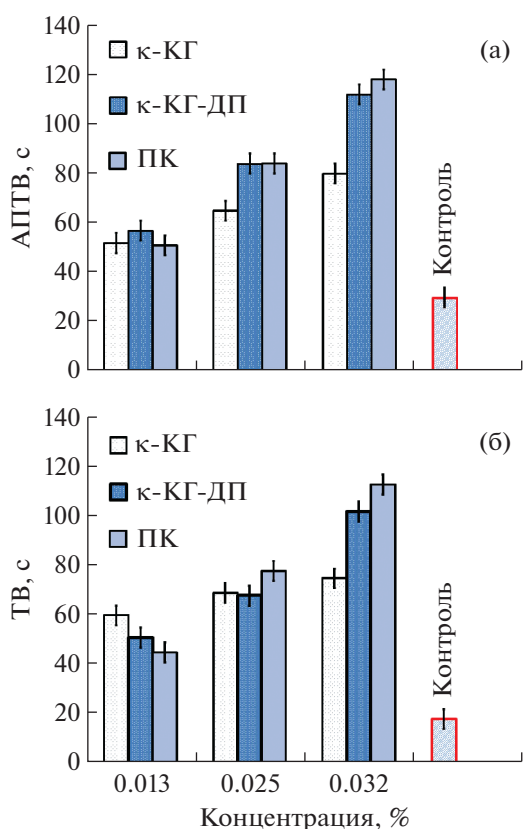


Рис. 4. Диаграмма зависимости АПТВ (а) и ТВ (б) от концентрации нанокompозита Au<sup>0</sup>NCH/к-КГ-ДП, к-КГ и к-КГ-ДП.

быстрой фракции. Медленная фракция частиц,  $R_h$  которых варьирует в интервале 280–811 нм, вероятно, соответствует присутствующим в растворе нанокompозита агрегатам наночастиц, образовавшимся в водном растворе композита, вследствие активного вовлечения функциональных групп к-КГ в образование водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий как между “свободными” (не участвующими в стабилизации поверхности наночастиц) макромолекулами к-каррагинана, так и макромолекулами на поверхности наночастиц.

Переход к числовому распределению  $R_h$  частиц идентифицируется присутствием только одной фракции мелких ( $R_h$  3.4–5.4 нм) частиц, преобладающих в растворе. Отсутствие двух других фракций частиц, предположительно соответствующих к-КГ-ДП-стабилизированным агломератам или скоплениям Au<sup>0</sup>NCH, может быть обусловлено их небольшим количеством в объеме анализируемого образца [26].

$\zeta$ -потенциал водного раствора нанокompозита исходного к-КГ-ДП является достаточно высоким – 36.7 мВ, вероятно, вследствие его полианионной природы. Тогда как введение в его состав

наночастиц Au<sup>0</sup> с формированием нанокompозита Au<sup>0</sup>NCH/к-КГ-ДП (2.9% Au) сопровождается увеличением  $\zeta$ -потенциала до –48.7 мВ вследствие ионизации поверхности твердой фазы Au<sup>0</sup> в водном растворе и формирования двойного электрического слоя на поверхности частиц, предотвращающего тем самым их агрегацию [27].

Влияние золотосодержащего нанокompозита Au<sup>0</sup>NCH/к-КГ-ДП, а также к-КГ и к-КГ-ДП (для сравнения) на свертывающую систему крови исследовали измерением АПТВ и тромбинового времени, которые являются стандартизированными коагуляционными пробами, чувствительными к различным плазменным дефектам свертывания, особенно к дефициту XII, XI, IX, VIII факторов [28]. Определение АПТВ позволяет оценить общую сохранность функций факторов свертывания, выявить дефицит или нарушение функций некоторых факторов свертывания и контактных факторов внутреннего (VIII, IX, XI, XII, прекалликреина, высокомолекулярных кининов) и общего пути свертывания (включая факторы II, V, X и I) [29, 30]. Тогда как ТВ позволяет определить продолжительность превращения фибриногена в фибрин в цитратной плазме крови после добавления в нее экзогенного тромбина и кальция [31]. Скорость образования фибринового сгустка зависит главным образом от количества и функциональной полноценности фибриногена и присутствия в крови антикоагулянтов [32]. Увеличение значения АПТВ обусловлено торможением внутреннего пути свертывания цитратной бедной тромбоцитами плазмы, в то время как увеличение значения ТВ указывает на ингибирование активации фибриногена экзогенным тромбином. Для потенциального антикоагулянта необходимым является удлинение времени свертывания (АПТВ) в 2–2.5 раза по сравнению с контролем (в отсутствие антикоагулянта время свертывания – 28–34 с), а время образования сгустка (ТВ) под влиянием антикоагулянта должно вырасти в 4–5 раз при контрольных значениях 16–20 с [33, 34].

Согласно полученным данным все исследуемые образцы Au<sup>0</sup>NCH/к-КГ-ДП, к-КГ и к-КГ-ДП увеличивают значения АПТВ и ТВ, проявляя выраженное концентрационно-зависимое антикоагулянтное действие (рис. 4).

Выраженное изменение величин АПТВ и ТВ под действием к-КГ, к-КГ-ДП и Au<sup>0</sup>NCH/к-КГ-ДП, предположительно, свидетельствует об их влиянии как на внутренний, так и на внешний путь свертывания крови. Исследование концентрации зависимости антикоагулянтной активности к-КГ и к-КГ-ДП и Au<sup>0</sup>NCH/к-КГ-ДП позволило определить адекватную концентрацию данных объектов, равную 0.025%, так как именно при этой концентрации наблюдались

значения АПТВ и ТВ в диапазоне 65–84 и 68–78 с соответственно. В растворах с концентрацией 0.032% величины АПТВ и ТВ варьировали в интервале 80–118 и 68–113 с соответственно, т.е. время свертывания было удлинено более чем 2.5 и 5 раз, требуемого для потенциального антикоагулянта. При наименьшей концентрации растворов, равной 0.013%, удлинение величин АПТВ и ТВ оказалось меньше требуемого значения (рис. 3).

Известно, что антикоагулянтная активность полианионных сульфатированных полисахаридов во многом зависит от наличия и количества сульфатных групп в их составе, которые могут связываться с аминокислотными остатками гепаринсвязывающих протеинов. Также известно, что антикоагулянтная активность сульфатированных галактанов зависит от их структуры, в том числе от молекулярной массы, так как механизм их антикоагулянтного действия включает в себя стадию образования комплекса “ингибитор–тромбин”, при этом галактан выступает в качестве связующего компонента данного комплекса. Неизменность исходного количества отрицательно заряженных сульфэфирных групп в составе и строения молекул к-КГ-ДП и наноконпозита Au<sup>0</sup>НЧ/к-КГ-ДП по сравнению с к-КГ определяет сохранение их антикоагулянтной активности. Тогда как имеющиеся отличия величин молекулярной массы данных объектов, вероятно, носит несущественный характер и не обуславливает каких либо заметных изменений антикоагулянтной активности. Введение Au<sup>0</sup>НЧ в полисахаридную матрицу к-КГ-ДП в количестве 2.9% не приводит к изменению его антикоагулянтной активности, что указывает на преимущественно полисахаридопосредованность данного вида активности и безопасность его использования для синтеза наноматериалов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, с использованием восстанавливающего и стабилизирующего потенциала природного сульфатированного полисахарида к-каррагинана получена биологически активная наноструктурированная биополимерная система “Au<sup>0</sup>НЧ/полисахарид”. С использованием комплекса современных методов исследования охарактеризованы состав полученного наноконпозита и его наноморфологические характеристики (размерное распределение, средний размер, форма наночастиц, тип распределения). Впервые установлено, что наноконпозит Au<sup>0</sup>НЧ/к-КГ-ДП проявляет выраженную антикоагулянтную активность, влияя на внутренний и внешний путь свертывания крови на уровне полисахаридной матрицы каррагинана без каких-либо эффектов Au<sup>0</sup>НЧ. Продемонстрировано, что перевод золота в

нанодисперсное состояние и стабилизация его к-каррагинаном приводят к расширению диапазона его биологической активности, что обуславливает перспективность применения наноматериалов на его основе в биомедицинских приложениях.

В экспериментах использовали материалы и оборудование БАЦКП Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН. Микрофотографии образца получены на оборудовании ЦКП “Ультрамикроанализ” Лимнологического института СО РАН.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Burketova L., Martinec J., Siegel J. et al. // Biotechnol. Adv. 2022. V. 58. P. 107929.*  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107929>
2. *Ahmad Z., Tahseen S., Wasi A. et al. // Nanomaterials. 2022. V. 12. P. 2667.*  
<https://doi.org/10.3390/nano12152667>
3. *Graily-Moradi F., Maadani Mallak A., Ghorbanpour M. Biogenic Synthesis of Gold Nanoparticles and Their Potential Application in Agriculture. Singapore: Springer, 2020. P. 11.*  
[https://doi.org/10.1007/978-981-15-2985-6\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-15-2985-6_11)
4. *Shamaila S., Zafar N., Riaz S. et al. // Nanomaterials (Basel). 2016. V. 14. P. 71.*  
<https://doi.org/10.3390/nano6040071>
5. *Dutta P.P., Bordoloi M., Gogoi K. et al. // Biomed Pharmacother. 2017. V. 91. P. 567.*  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.032>
6. *Elbagory A.M., Hussein A.A., Meyer M. // Int. J. Nanomedicine. 2019. V. 19. P. 9007.*  
<https://doi.org/10.2147/IJN.S216972>
7. *Rajeshkumar S. // J. Genet. Eng. Biotechnol. 2016. V. 14. P. 195.*  
<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.05.007>
8. *Dykman L.A. // Expert Rev. Vaccines. 2020. V. 19. P. 465.*  
<https://doi.org/10.1080/14760584.2020>
9. *Sayed-Pathan N.I., Jadon R.S., Gajbhiye K.R., Gajbhiye V. Tailored gold nanoparticles for improved control over drug release. Academic Press, 2022. P. 283.*  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824456-2.00008-4.10>
10. *Suh K.S., Lee Y.S., Seo S.H. et al. // Biol. Trace Elem. Res. 2013. V. 153. P. 428.*  
<https://doi.org/10.1007/s12011-013-9679-7>
11. *Deb S., Patra H.K., Lahiri P. et al. // Nanomedicine. 2011. V. 7. P. 376.*  
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.01.007>
12. *Ilinskaya A.N., Dobrovol'skaia M.A. // Nanomedicine (London). 2013. V. 8. P. 969.*  
<https://doi.org/10.2217/nnm.13.49>
13. *Akchurin G.G., Ivanov A.N., Kirichuk V.F. et al. // Plasmonics in Biology and Medicine. 2008. V. 13. P. 68690V.*  
<https://doi.org/10.1117/12.765076>
14. *Siddiqi K.S., Husen A. // Nanoscale Res. Lett. 2016. V. 11. P. 400.*  
<https://doi.org/10.1186/s11671-016-1607-2>

15. *Li N., Chen Y., Zhang Y.M. et al.* // *Sci Rep.* 2014. V. 4. P. 4164.  
<https://doi.org/10.1038/srep04164>
16. *Lesnichaya M.V., Sukhov B.G., Aleksandrova G.P. et al.* // *Carbohydr. Polym.* 2017. V. 175. P. 18.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.040>
17. *Лесничая М.В., Сухов Б.Г.* // *Российские нанотехнологии.* 2021. Т. 16. С. 222.  
<https://doi.org/10.1134/S1992722321020096>
18. *Александрова Г.П., Боймирзаев А.С., Лесничая М.В. и др.* // *Журн. общей химии.* 2015. Т. 85. С. 317.  
<https://doi.org/10.1134/S107036321502022X>
19. *Лесничая М.В., Александрова Г.П., Сухов Б.Г. и др.* // *Химия природных соединений.* 2013. Т. 49. С. 347.  
<https://doi.org/10.1007/s10600-013-0625-x>
20. *Грищенко Л.А., Медведева С.А., Александрова Г.П. и др.* // *Журн. общей химии.* 2006. Т. 76. С. 1159.  
<https://doi.org/10.1134/S1070363206070189>
21. *Лесничая М.В., Александрова Г.П., Феоктистова Л.П. и др.* // *Докл. РАН.* 2011. Т. 440. С. 639.  
<https://doi.org/10.1134/S0012500811100065>
22. *Оленин А.Ю., Лисичкин Г.В.* // *Успехи химии.* 2011. Т. 80. С. 635.  
<https://doi.org/10.1070/RC2011v080n07ABEH004201v>
23. *Nguyen T.K., Maclean N., Mahiddine S.* Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution // *Chem. Rev.* 2014. V. 114. P. 7610.  
<https://doi.org/10.1021/cr400544s>
24. *Casillo A., Fabozzi A., Russo Krauss I. et al.* // *Biomacromolecules.* 2021. V. 12. P. 1445.  
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c01659>
25. *Burchard W.* Light Scattering from Polysaccharides as Soft Materials. Dordrecht: Springer, 2008.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4465-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4465-6_9)
26. *Хлебцов Б.Н., Хлебцов Н.Г.* // *Коллоидный журнал.* 2011. Т. 73. С. 106.
27. *Carneiro-da-Cunha M.G., Cerqueira M.A., Souza B.W.S. et al.* // *Carbohydrate Polymers.* 2011. V. 5. P. 522.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.03.001>
28. *Capoor M.N., Stonemetz J.L., Baird J.C. et al.* // *PLoS One.* 2015. V. 11. P. e0133317.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133317>
29. *Bronic A., Margetic S., Coen Herak D. et al.* // *Biochem Med (Zagreb).* 2021. 15. P. 020708.  
<https://doi.org/10.11613/BM.2021.020708>
30. *Rasmussen K.L., Philips M., Tripodi A. et al.* // *Eur. J. Haematol.* 2020. V. 104. P. 519.  
<https://doi.org/10.1111/ejh.13394>
31. *Levy J.H., Szlam F., Wolberg A.S. et al.* // *Clin. Lab. Med.* 2014. V. 34. P. 453.  
<https://doi.org/10.1016/j.cll.2014.06.005>
32. *Kong C., Xu B., Qiu G. et al.* // *Int. J. Nanomedicine.* 2022. V. 17. P. 5391.  
<https://doi.org/10.2147/IJN.S373282>
33. *Urban P., Liptrott N.J., Bremer S.* // *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed Nanobiotechnol.* 2019. p. e1546.  
<https://doi.org/10.1002/wnan.1546>
34. *de la Harpe K.M., Kondiah P.P.D., Choonara Y.E. et al.* // *Cells.* 2019. V. 8. P. 1209.  
<https://doi.org/10.3390/cells8101209>