

ВЛИЯНИЕ БИОПОЛИМЕРОВ И ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ ИМИ МИКРОЧАСТИЦ ВАТЕРИТА НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ

© 2024 г. Д. В. Григорьева^{1, *}, Е. В. Михальчик², Н. Г. Балабушевич^{2, 3},
Д. В. Мосиевич³, М. А. Мурина², О. М. Панасенко², А. В. Соколов^{2, 4} И. В. Горудко¹

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

²Научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика Ю. М. Лопухина
Москва, Россия

³Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: dargr@tut.by

Поступила в редакцию 16.04.2024 г.

После доработки 20.05.2024 г.

Принята к публикации 21.05.2024 г.

Перспективными формами доставки лекарственных соединений являются микрочастицы ватерита, представляющие собой метастабильную форму карбоната кальция. Однако для более эффективной доставки целевых молекул (увеличения включения и удерживания) микрочастицы ватерита необходимо функционализировать биополимерами. Было исследовано влияние полисахаридов, муцина и микрочастиц ватерита, а также гибридных микрочастиц ватерита с вышеупомянутыми биополимерами на агрегационную активность тромбоцитов. Установлено, что фукоидан, гепарин и декстрансульфат (при внесении в обогащенную тромбоцитами плазму) и муцин (при добавлении к изолированным тромбоцитам) индуцировали агрегацию клеток. Пектин и хондроитинсульфат дозозависимым образом ингибировали АДФ- и тромбин-индуцированную агрегацию, муцин подавлял АДФ-индуцированную, а декстрансульфат – тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Микрочастицы ватерита в концентрации 100–1000 мкг/мл не влияли на агрегацию изолированных тромбоцитов, но вызывали 10–15%-ную агрегацию клеток в плазме; при этом в концентрации 1000 мкг/мл микрочастицы ватерита на ~ 30% препятствовали агонист-индуцированной агрегации клеток. Установлено, что гибридные микрочастицы ватерита с фукоиданом или гепарином при внесении как в обогащенную тромбоцитами плазму, так и к изолированным клеткам способны инициировать агрегацию тромбоцитов. Микрочастицы ватерита, функционализированные пектином или хондроитинсульфатом, не оказывали влияния на спонтанную агрегацию клеток и не влияли (с хондроитинсульфатом) или ингибировали (с пектином) агонист-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Таким образом, использование гибридных микрочастиц ватерита с пектином или фукоиданом/гепарином может быть перспективным для доставки препаратов, направленных на модуляцию (ингибирование – с пектином или активацию – с фукоиданом/гепарином) тромбоцитарного звена гемостаза.

Ключевые слова: тромбоцит, агрегация, микрочастица ватерита, полисахарид, муцин, аденозиндифосфат, тромбин

DOI: 10.31857/S0869813924060107, EDN: ВЕМОСМ

ВВЕДЕНИЕ

Среди новых, быстро развивающихся систем доставки лекарственных соединений особое внимание уделяется тем системам, которые изготовлены из уже одобренных материалов для биомедицинского использования. К последним относятся кристаллы карбоната кальция, которые одобрены Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США, и используются в качестве дешевого армирующего материала для бумажных и пластиковых покрытий, при производстве продуктов питания, средств гигиены и косметики. Себестоимость производства систем доставки на основе частиц из карбоната кальция существенно ниже (в 250–500 раз), чем липосом, наночастиц металлов и других материалов [1]. Кроме того, они характеризуются уникальными механическими, физическими и химическими свойствами, низкой токсичностью, биосовместимостью и биоразлагаемостью [2, 3].

Ватерит представляет собой метастабильную фазу (кристаллическую полиморфную модификацию) карбоната кальция. Частицы ватерита особенно выделяют среди других полиморфов карбоната кальция с точки зрения их потенциального применения в биомедицине, включая доставку лекарств, ввиду их пористой морфологии и развитой внутренней структуры. Последнее свойство позволяет загружать в частицы ватерита молекулы разнообразной природы. Широкий спектр биологически активных веществ, в том числе низкомолекулярные соединения и макромолекулы, включают в частицы ватерита методом физической адсорбции в поры или соосаждения в процессе формирования самих частиц.

Одним из основных недостатков микрочастиц ватерита является довольно быстрая перекристаллизация в водных средах в более термодинамически устойчивый непористый кальцит [4, 5] или их полное растворение [6, 7]. На скорость этих процессов влияют физико-химические свойства среды, такие как pH [8], температура [5], ионная сила [9], а также наличие различных добавок [10–12]. С одной стороны, упомянутые выше свойства частиц ватерита дают возможность использовать их для контролируемого высвобождения лекарственных препаратов, например, для pH-зависимого высвобождения лекарств, доставляемых в места локализации опухоли [7, 13, 14]. А с другой стороны, при использовании частиц в качестве контейнеров для включения лекарств в системы доставки, при изготовлении платформ для тканевой инженерии, в продуктах питания/косметических средствах, предназначенных для длительного действия, требуется стабилизация ватерита и подавление его рекристаллизации. Одним из подходов для увеличения стабильности частиц ватерита является получение их гибридных форм, содержащих полимеры [5, 15, 16]. Например, муцин замедляет скорость перекристаллизации ватерита в кальцит [16].

Одним из надежных способов увеличения количества загружаемого водорастворимого лекарственного препарата в ватеритные системы доставки является включение биополимеров [17]. Например, наличие декстрансульфата в частицах ватерита привело к увеличению загрузки пептидов в 5–10 раз, при адсорбции декстрансульфата нагрузка целевых веществ была приблизительно в 2 раза выше, чем при соосаждении [18]. Так, связывание лизоцима с гепарином было использовано для эффективной загрузки белка в гепарин-содержащие частицы ватерита [19]. Способность муцина к электростатическим, гидрофобным взаимодействиям и к образованию водородных связей с различными терапевтическими средствами используется для улучшения загрузки в системы доставки на основе ватерита. В работах [16, 20] муцин применяли для увеличения включения в ватерит доксорубин и апротинина, кроме того, высвобождение соединений из таких частиц было более пролонгированным по сравнению с частицами, не содержащими муцин. В работе [21] было показано, что при внутрибрюшинном введении крысам, инокулированным гепатомой Зейделя, доксирубицин-содержащих частиц ватерита, легированных декстрансульфатом, наблюдается

продолжительное высвобождение антрациклинового антибиотика и достигается его эффективная концентрация, которая ингибирует рост опухоли. Улучшенный гипогликемический эффект у крыс был продемонстрирован после орального введения нагруженных инсулином наночастиц ватерита по сравнению с подкожной инъекцией препарата. Ватерит, покрытый слоем из фолиевой и гиалуроновой кислоты, обеспечивал эффективную защиту инсулина от потери биологической активности [22]. Сообщалось [23] также о введении ибупрофена в микрочастицы ватерита, модифицированные полистиролсульфонатом натрия. Было показано, что загрузка ибупрофена в поры частиц может достигать почти 10% от их массы, что является оптимальным для доставки. Ибупрофен, загруженный в поры микрочастиц ватерита с полистиролсульфонатом натрия, быстрее высвобождался в желудочный сок и медленнее в кишечную жидкость по сравнению с препаратом, высвобождаемым из частиц ватерита без полимерного покрытия.

Дополнением к вышеперечисленным важным свойствам ватерита, перспективным для использования в медицине является выделение при его растворении Ca^{2+} . Например, способность Ca^{2+} стимулировать активность остео- и одонтобластов используется при создании на основе ватерита каркасов для регенерации костной и зубной тканей [24–26]. Высвобождаемые из ватерита ионы Ca^{2+} эффективно сшивают анионные полисахариды (например, альгинат натрия, хитозан) с образованием гомогенных гидрогелей, используемых для создания систем доставки лекарств и ранозаживляющих средств [27–30].

В работах [31, 32] на основе карбоната кальция были разработаны микрочастицы с включением тромбина и протонированной транексамовой кислоты, которые при введении грызунам и кроликам в место обширного кровотечения при контакте с кровью быстро выделяют пузырьки CO_2 , что способствует их активному переносу в потоке крови и доставке тромбина в глубокие места повреждения сосудов. Такие системы доставки представляются перспективными для терапии геморрагических состояний.

При использовании ватеритных микрочастиц для доставки целевых лекарственных средств возможно их взаимодействие с клетками крови. Это особенно важно при разработке препаратов, направленных на коррекцию работы системы гемостаза, важная роль в которой отводится, прежде всего, тромбоцитам. Однако комплексные исследования влияния микрочастиц ватерита на функциональную активность тромбоцитов не проводились. Поскольку включение в ватеритные микрочастицы биополимеров позволяет не только стабилизировать, но и усилить их адгезию к клеткам [33], что особенно важно при разработке средств доставки лекарств, нацеленных на коррекцию геморрагических состояний, нами было исследовано влияние гибридных микрочастиц ватерита с биополимерами на агрегацию изолированных тромбоцитов, а также на агрегацию тромбоцитов в плазме крови.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали следующие биополимеры: фукоидан из *Fucus vesiculosus* (20–200 кДа, содержание серы 7–11%, F-5631); пектин из яблок (30–100 кДа, степень этерификации 50–75%, 6.7% метоксигрупп, 74% галактуроновой кислоты, P-8471); хондроитинсульфат А из бычьей трахеи (20–30 кДа, С-8529) и муцин III типа из желудка свиньи (600 кДа, 0.5–1.5% сиаловых кислоты, M-1778) фирмы Sigma-Aldrich (США); декстрансульфат *Leuconostoc* ssp. (500 кДа, 2.3 сульфогруппы на звено, 31395) фирмы Fluka (Германия) и гепарин (10–20 кДа) фирмы Spofa (Чехия). В работе использовали также аденозиндифосфат (АДФ) фирмы Sigma-Aldrich (США).

Микрочастицы ватерита получали путем смешивания растворов CaCl_2 и Na_2CO_3 в 0.05 М трис-буфере (pH 7.0), как это было описано ранее [16]. Для синтеза гибридных

ных микрочастиц ватерита с биополимерами предварительно смешивали раствор CaCl_2 с полисахаридами или муцином [34, 35]. Синтезированные микрочастицы ватерита промывали бидистиллированной водой и высушивали лиофильно. Средний диаметр сферических микрочастиц ватерита определяли методом сканирующей электронной микроскопии (микроскоп Zeiss Merlin, Zeiss, Германия) с помощью программы ImageJ, анализируя не менее 100 частиц. ζ -потенциал гибридных микрочастиц ватерита изучали методом динамического светорассеяния на установке Malvern Zetasizer Nano ZS (Великобритания). Диаметр и ζ -потенциал для нативных микрочастиц ватерита составили соответственно 3.6 ± 0.7 мкм и 2 ± 1 мВ; гибридных микрочастиц ватерита с декстрансульфатом – 3.8 ± 0.8 мкм и -13 ± 2 мВ; хондроитинсульфатом – 1.9 ± 0.5 мкм и -12 ± 2 мВ; гепарином – 2.0 ± 0.3 мкм и -9 ± 2 мВ; фукоиданом – 2.1 ± 0.5 мкм и -12 ± 2 мВ; пектином – 2.3 ± 0.7 мкм и -12 ± 2 мВ; муцином – 5.8 ± 0.7 мкм и -7 ± 1 мВ. Для получения тромбина использовали протромбин, отделенный от церулоплазмينا с помощью аффинной хроматографии на неомицин-агарозе и активированный при фильтрации через колонку с экарин-агарозой, с дополнительной очисткой α -тромбина при хроматографии на бензамидин-агарозе [36].

Для получения обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП), а также изолированных тромбоцитов использовали донорскую кровь, стабилизированную цитратом натрия (109 мМ в соотношении 9: 1 по объему), полученную из Республиканского научно-практического центра трансфузиологии и медицинских биотехнологий (Минск, Беларусь). Все процедуры по выделению тромбоцитов проводились при комнатной температуре с использованием исключительно пластиковой посуды. ОТП получали центрифугированием крови при 200 g в течение 10 мин, бестромбоцитарную плазму (БТП) – центрифугированием крови при 1600 g в течение 15 мин. Отмытые тромбоциты выделяли путем двукратного центрифугирования ОТП при 1600 g в течение 3 мин с последующим отмыванием осадка в трис/ЭДТА-буфере, содержащем (мМ) 13.3 трис, 120 NaCl, 15.4 KCl, 6 D-глюкозы и 1.5 ЭДТА (pH 6.9). Использование данного буфера предотвращало спонтанную агрегацию и слипание тромбоцитов, которые хранили при комнатной температуре в концентрации 2.5×10^9 кл/мл в течение не более 3 ч.

Агрегацию тромбоцитов исследовали с применением компьютеризированного анализатора агрегации AP2110 («СОЛАР», Минск, Беларусь) регистрируя изменение светопропускания клеточных суспензий на длине волны 540 нм при 37 °С и постоянном перемешивании. При исследовании агонист-индуцированной агрегации концентрацию тромбоцитов в ОТП доводили до 2.5×10^8 кл/мл разбавлением БТП, концентрацию отмытых тромбоцитов доводили до 2.5×10^8 кл/мл разбавлением фосфатно-солевым буфером (ФСБ), содержащим (мМ) 8.7 Na_2HPO_4 , 1.5 KH_2PO_4 , 137.0 NaCl, 2.7 KCl, 1.0 CaCl_2 и 0.5 MgCl_2 (pH 7.4), инкубировали в течение 2 мин при 37 °С и постоянном перемешивании, после чего добавляли тестируемые препараты в необходимой концентрации и/или агонист (2.5 мкМ АДФ к ОТП или 1 мкг/мл тромбина к изолированным тромбоцитам). Кривые агрегации записывали в течение 10 мин. Для количественной оценки агрегации использовали степень агрегации клеток, которая равнялась максимальному изменению величины светопропускания суспензии клеток [37].

Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего значения ($M \pm SE$). Минимальное количество независимых экспериментов, которое проводилось для каждой экспериментальной точки, составляло $n = 5$ при отсутствии других указаний. Достоверность различий средних рассчитывали с применением t -критерия Стьюдента, принимая различия достоверными при уровне значимости $p < 0.05$. Кинетические кривые представлены как типичные для серии из 5–7 независимых экспериментов. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного пакета Origin 7.0 (OriginLab Corporation, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние свободных биополимеров (фукоидана, пектина, муцина, гепарина, хондроитинсульфата и декстрансульфата), а также нативных и функционализированных биополимерами микрочастиц ватерита на спонтанную и АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в ОТП.

Было обнаружено, что такие полисахариды как фукоидан, гепарин и декстрансульфат (рис. 1а, б) индуцировали агрегацию тромбоцитов в плазме; пектин, муцин и хондроитинсульфат не обладали такой способностью (данные не представлены). Наиболее сильным активатором агрегации тромбоцитов в ОТП оказался фукоидан, при внесении которого в диапазоне концентраций 100–1000 мкг/мл величина светопропускания клеточной суспензии составляла $50 \pm 10\%$. Также необходимо отметить, что фукоидан в значительно меньших концентрациях, чем остальные биополимеры, инициировал концентрационно-зависимую агрегацию тромбоцитов (рис. 1а, б). Гепарин и декстрансульфат обладали меньшей агрегационной активностью в отношении тромбоцитов: так, при внесении данных соединений в концентрации 1000 мкг/мл величина светопропускания составила $29 \pm 13\%$ и $32 \pm 12\%$ соответственно.

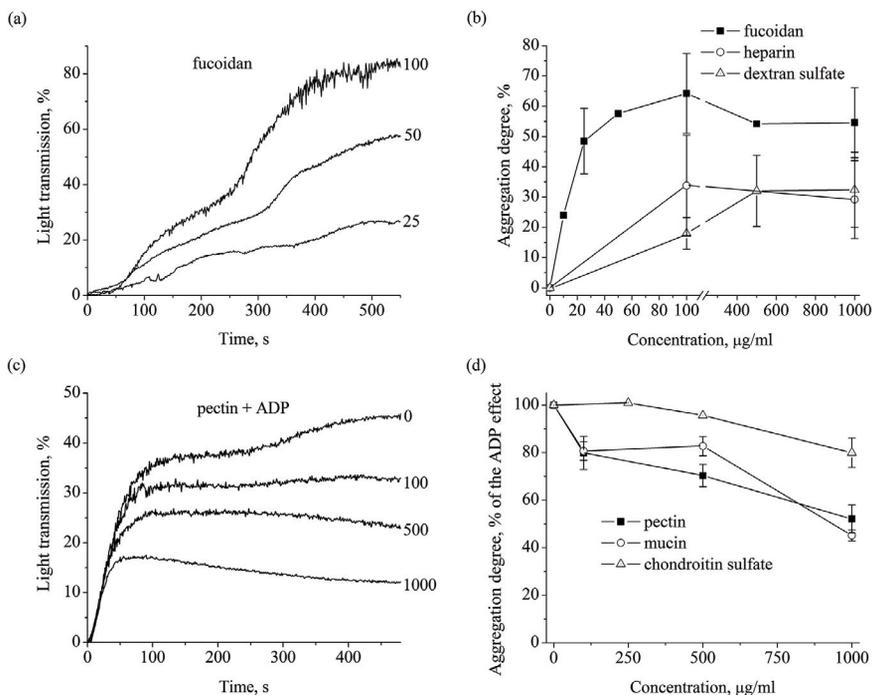


Рис. 1. Влияние тестируемых биополимеров на агрегацию тромбоцитов в ОТП. (а) и (с) – типичные кинетические кривые агрегации тромбоцитов в ОТП, инициированной внесением фукоидана (а) или АДФ в присутствии различных концентраций пектина (с). (б) и (д) – зависимости степени спонтанной (б) или индуцированной АДФ (д) агрегации тромбоцитов в ОТП от концентрации фукоидана, гепарина и декстрансульфата (б) или пектина, муцина и хондроитинсульфата (д). Используемая концентрация АДФ – 2.5 мкМ. Правее кинетических кривых числами указаны используемые концентрации биополимеров в мкг/мл.

Далее было исследовано влияние муцина, пектина и хондроитинсульфата, которые сами по себе не индуцировали агрегацию тромбоцитов в ОТП, на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Пектин и муцин концентрационно-зависимым образом (рис. 1с, d) ингибировали АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов: максимальный эффект регистрировался при внесении препаратов в концентрации 1000 мкг/мл: подавление агрегации на ~ 48% при использовании пектина и на ~ 55% при использовании муцина. Хондроитинсульфат в диапазоне концентраций 100–500 мкг/мл не влиял, а в концентрации 1000 мкг/мл снижал на ~ 20% АДФ-индуцированную агрегацию клеток.

При исследовании влияния синтезированных микрочастиц ватерита на агрегацию тромбоцитов было выявлено, что внесение самих микрочастиц ватерита инициировало небольшую агрегацию тромбоцитов в ОТП, которая составляла порядка $12 \pm 2\%$ (рис. 2). Микрочастицы ватерита не оказывали влияния на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов вплоть до концентрации 500 мкг/мл (рис. 2) и лишь в концентрации 1000 мкг/мл ингибировали на ~ 30% АДФ-индуцированную агрегацию (данные не представлены).

Гибридные микрочастицы ватерита с фукоиданом, гепарином и декстрансульфатом при внесении в ОТП вызывали агрегацию тромбоцитов, что коррелировало со спо-

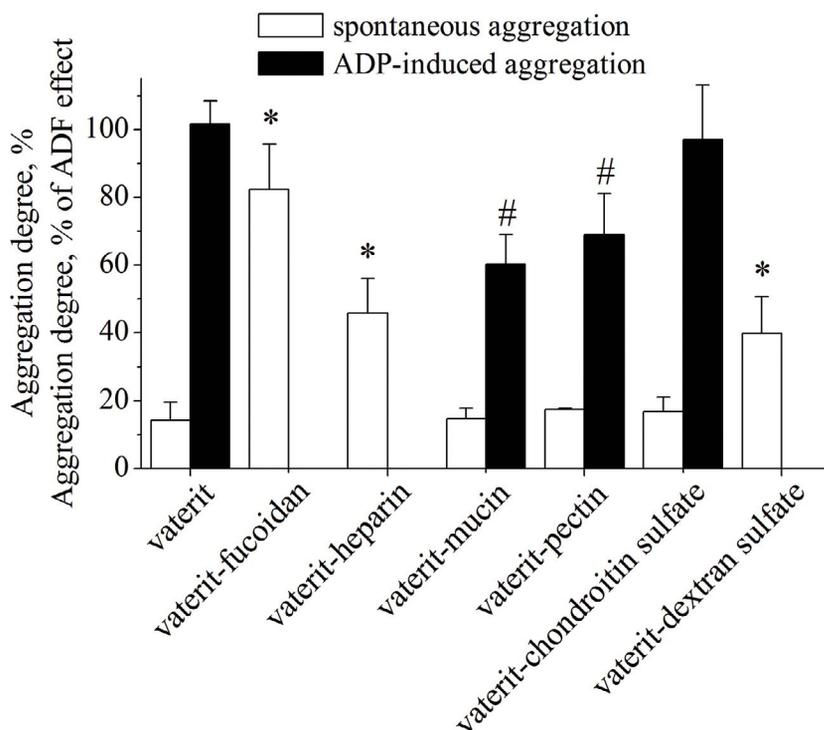


Рис. 2. Влияние нативных и функционализированных биополимерами микрочастиц ватерита (250 мкг/мл) на спонтанную и АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в ОТП. Концентрация АДФ – 2.5 мкМ. * $p < 0.05$ по сравнению с эффектом нативных микрочастиц ватерита. В случае АДФ-индуцированной агрегации за 100% принята величина степени агрегации в контроле (при добавлении 2.5 мкМ АДФ). # $p < 0.05$ по сравнению с эффектом АДФ.

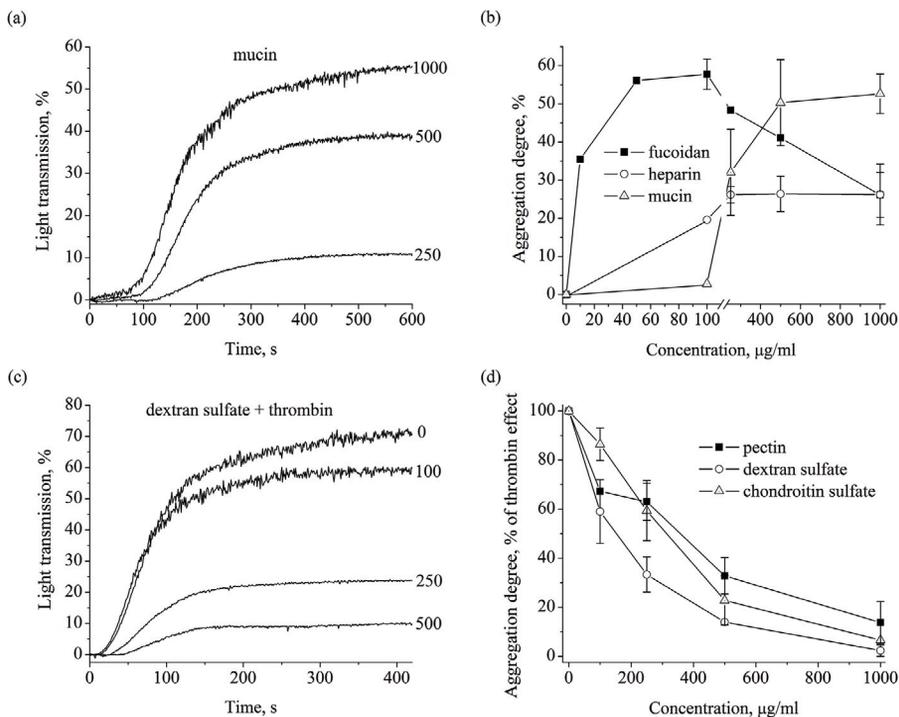


Рис. 3. Влияние тестируемых биополимеров на агрегацию изолированных тромбоцитов. (а) и (с) – типичные кинетические кривые агрегации изолированных тромбоцитов, инициированной внесением муцина (а) или тромбина в присутствии различных концентраций декстрансульфата (с). (b) и (d) – зависимости степени спонтанной (b) или индуцированной тромбином (d) агрегации изолированных тромбоцитов от концентрации фукоидана, гепарина и муцина (b) или пектина, декстрансульфата и хондроитинсульфата (d). Используемая концентрация тромбина – 1 мкг/мл. Правее кинетических кривых числами указана используемая концентрация биополимеров в мкг/мл.

способностью соответствующих биополимеров индуцировать спонтанную агрегацию. По всей видимости, агрегационный эффект этих гибридных микрочастиц ватерита мог быть обусловлен входящими в их состав биополимерами.

Что касается микрочастиц ватерита с муцином, пектином или хондроитинсульфатом, то их эффект на спонтанную агрегацию тромбоцитов в ОТП был сопоставим с действием нативного ватерита. Следует отметить, что добавление гибридных микрочастиц ватерита с муцином или пектином в ОТП приводило к снижению АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. Микрочастицы ватерита с хондроитинсульфатом не оказывали влияния на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов (рис. 2).

Влияние свободных биополимеров (фукоидана, пектина, муцина, гепарина, хондроитинсульфата и декстрансульфата), а также нативных и функционализированных биополимерами микрочастиц ватерита на спонтанную и тромбин-индуцированную агрегацию изолированных тромбоцитов

При исследовании спонтанной агрегации изолированных тромбоцитов было установлено, что внесение к отмытым тромбоцитам фукоидана, гепарина и муцина инициировало их агрегацию (рис. 3а, б). Наиболее сильными индукторами агрегации являлись муцин и фукоидан (рис. 3а, б). Хондроитинсульфат, декстран сульфат и пектин не

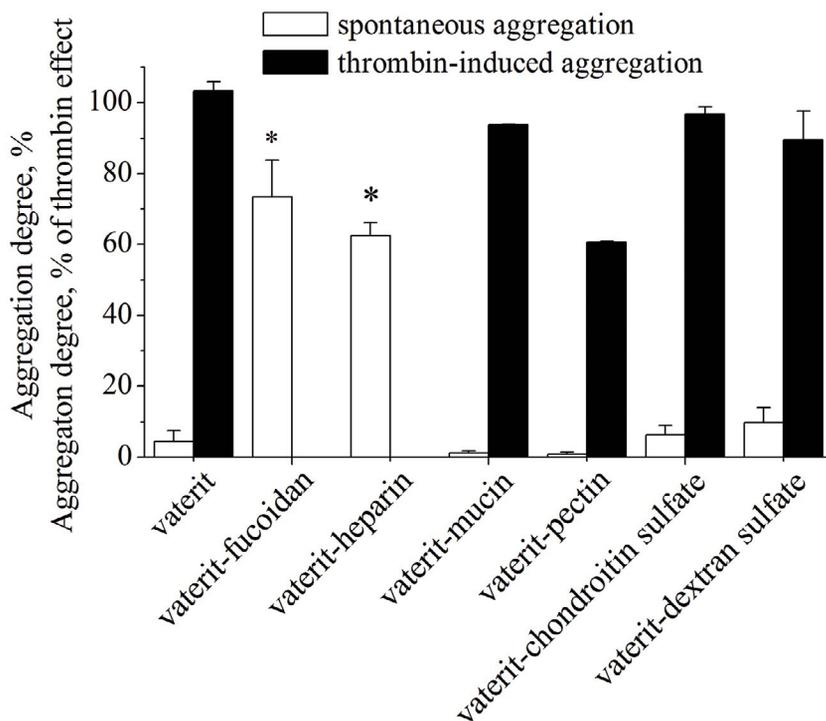


Рис. 4. Влияние нативных и функционализированных биополимерами микрочастиц ватерита (250 мкг/мл) на спонтанную и тромбин-индуцированную агрегацию изолированных тромбоцитов. Концентрация тромбина – 1 мкг/мл. * $p < 0.05$ по сравнению с эффектом нативных микрочастиц ватерита. В случае тромбин-индуцированной агрегации за 100% принята величина степени агрегации в контроле (при добавлении 1 мкг/мл тромбина). # $p < 0.05$ по сравнению с эффектом тромбина.

индуцировали спонтанную агрегацию изолированных тромбоцитов, при этом концентрационно-зависимым образом ингибировали тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов (рис. 3с, d). Практически 100%-ное подавление тромбин-индуцированной агрегации клеток регистрировалось при использовании вышеупомянутых биополимеров в концентрации 1000 мкг/мл.

Внесение самих микрочастиц ватерита не влияло на спонтанную агрегацию изолированных тромбоцитов (рис. 4) во всем исследуемом концентрационном диапазоне (100–1000 мкг/мл). Микрочастицы ватерита не оказывали влияния на тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов вплоть до концентрации 500 мкг/мл (рис. 4) и лишь в концентрации 1000 мкг/мл ингибировали на ~ 30% тромбин-индуцированную агрегацию клеток (данные не представлены) аналогично случаю АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в ОТП.

Инициаторами агрегации изолированных тромбоцитов среди тестируемых гибридных микрочастиц ватерита оказались микрочастицы ватерита с фукоиданом и гепарином, что коррелировало со способностью данных биополимеров вызывать агрегацию изолированных клеток. Следует отметить, что гибридные микрочастицы ватерита с муцином, в отличие от самого муцина, не вызывали агрегацию изолированных кле-

Таблица 1. Влияние свободных фукоидана, гепарина, пектина, муцина, декстрансульфата и хондроитинсульфата, а также данных биополимеров в составе микрочастиц ватерита на агрегацию тромбоцитов*

| | | фукоидан | гепарин | пектин | муцин | декстран-сульфат | хондроитин-сульфат |
|-----------------------------|--|----------|---------|--------|-------|------------------|--------------------|
| агрегация тромбоцитов в ОТП | спонтанная | + | + | – | – | + | – |
| | АДФ-индуцированная | н/о | н/о | ↓ | ↓ | н/о | = ↓ |
| | спонтанная в присутствии функционализированных частиц ватерита | + | + | – | – | + | – |
| | АДФ-индуцированная в присутствии функционализированных частиц ватерита | н/о | н/о | ↓ | ↓ | н/о | = |

| | | | | | | | |
|-------------------------------------|--|-----|-----|---|-----|---|---|
| агрегация изолированных тромбоцитов | спонтанная | + | + | – | + | – | – |
| | тромбин-индуцированная | н/о | н/о | ↓ | н/о | ↓ | ↓ |
| | спонтанная в присутствии функционализированных частиц ватерита | + | + | – | – | – | – |
| | тромбин-индуцированная в присутствии функционализированных частиц ватерита | н/о | н/о | ↓ | = | = | = |

* «+» – вызывает агрегацию, «–» – не вызывает агрегацию, «↓» – ингибирует агонист-индуцированную агрегацию, «=» – не влияет на агонист-индуцированную агрегацию, «н/о» – измерение не проводилось.

ток. Ингибирующий эффект (~ 40%) на тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов был выявлен для микрочастиц ватерита с пектином. Функционализированные декстрансульфатом, хондроитинсульфатом или муцином микрочастицы ватерита не оказывали влияния на агрегацию тромбоцитов в ответ на тромбин.

Эффекты свободных биополимеров, а также микрочастиц ватерита, функционализированных упомянутыми биополимерами, на спонтанную и индуцированную агрегацию изолированных тромбоцитов и тромбоцитов в ОТП суммированы в табл. 1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поиск новых средств доставки лекарственных соединений привел к рассмотрению карбоната кальция в форме ватерита в качестве перспективного объекта, обладающего идеальными механическими, физическими и химическими свойствами для включения

целевых молекул. Недавние исследования показали перспективность использования средств доставки на основе карбоната кальция для коррекции геморрагических состояний [29–32]. В данной работе были синтезированы гибридные микрочастицы ватерита с включением различных биополимеров и исследовано их влияние на агрегацию тромбоцитов – форменных элементов крови, которые играют важную роль как в обеспечении нормального гемостаза, так и в развитии патологических кровотечений и тромбозов. Тромбоциты вносят решающий вклад в сужение и восстановление просвета сосудов. Кроме того, тромбоциты взаимодействуют с другими клетками (лейкоцитами, эндотелиальными, гладкомышечными клетками) и играют важную роль в воспалении, сопутствующих патологиях и в развитии атеросклероза.

Нами было показано, что микрочастицы ватерита не влияют на агрегацию изолированных тромбоцитов, но вызывают небольшую агрегацию тромбоцитов в плазме (степень агрегации ~ 10–15%). Необходимо отметить, что микрочастицы ватерита как системы доставки не лишены недостатков, к которым относят, в том числе небольшое включение и быстрое высвобождение положительно заряженных молекул. Однако это препятствие можно преодолеть дополнительным введением в структуру микрочастиц ватерита природных биополимеров, например, полисахаридов, что приведет к возрастанию площади поверхности, пористости и увеличению включения и удерживания катионных молекул. Включение в состав микрочастиц ватерита биополимеров является одним из подходов для их стабилизации. Кроме того, использование биополимеров в составе ватерита позволяет увеличить способность включать целевые лекарственные вещества и при необходимости усилить адгезию микро/наночастиц ватерита к клеткам.

Биологически активные биополимеры природного происхождения нашли широкое применение в различных областях биотехнологий, в том числе для лечения и профилактики различных заболеваний и способны влиять на функциональные ответы иммунных клеток. Эти полимеры включают широкий круг подклассов, сходных с гепаринами, гликоаминогликанами, фукоиданом, сульфатами декстрана и др., способных регулировать также и систему гемостаза, оказывая как прокоагулянтные, так и антикоагулянтные эффекты. В качестве кандидатов для функционализации микрочастиц ватерита нами были выбраны фукоидан, гепарин, пектин, декстрансульфат, хондроитинсульфат и муцин, и вначале было исследовано действие этих соединений на агрегационную активность тромбоцитов.

Фукоиданы представляют собой класс богатых фукозой сульфатированных углеводов, обнаруженных в бурых морских водорослях и в иглокожих. Большинство фукоиданов различного происхождения состоят из сульфатированной L-фукозы, на долю которой приходится около 34–44%, небольшого количества галактозы, маннозы, ксилозы и уроновых кислот, а также ацетильных групп [39]. Хотя класс молекул, называемых «фукоиданы», сходны по своей биологической активности, в ряде случаев наблюдаются большие различия в проявляемых ими эффектах в зависимости от источника выделения, а также молекулярной массы, описанные в обзорах [39–41]. Полученные нами данные о сильной агрегантной активности используемого фукоидана согласуются с результатами работы [42], авторы которой показали, что фукоидан из *Fucus vesiculosus* индуцирует активацию тромбоцитов посредством тирозинкиназа-зависимого пути (SFK и SYK), который опосредуется через рецептор CLEC-2 и приводит к активации интегрина $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$.

Гепарин относится к семейству гликоаминогликанов, белковое ядро которого включает в основном остатки глицина и серина, 2/3 последнего связывается с полисахаридными цепями, в основе которых лежит цепочка из повторяющихся сульфатированного N-ацетил-D-глюкозамина, L-идуроновой кислоты и D-глюкуроновой кислоты [43]. Несмотря на то, что гепарин является наиболее широко используемым антикоагулянтом во всем мире, в литературе имеются данные о том, что он прямо [44, 45] или косвенно [46, 47] способствует агрегации тромбоцитов. Полученные нами данные об

агрегации изолированных тромбоцитов и тромбоцитов в ОТП в присутствии гепарина согласуются с данными авторов работ [43, 44], в которых показано, что нефракционированный гепарин вызывает агрегацию тромбоцитов и фосфорилирование рецептора тромбоцитарно-эндотелиальной агрегации 1-го типа (PEAR-1) в отмытых тромбоцитах и заметную активацию интегрина $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ в цельной крови; PEAR-1 в свою очередь стимулирует агрегацию тромбоцитов через сигнальный каскад SRC-PI3K β -АКТ. Примечательно, что, как и в работе [44], согласно нашим данным, гепарин вызывает гораздо более медленный агрегационный ответ, чем фукоидан из *Fucus vesiculosus*. По всей видимости, данный факт ассоциирован с большим размером и разветвленностью фукоидана. Также необходимо отметить, что при добавлении гепарина регистрируется умеренная, но необратимая агрегация тромбоцитов, из чего можно сделать вывод о том, что, по всей вероятности, ответ тромбоцитов на гепарин не сопровождается высвобождением содержимого плотных и α -гранул.

Пектины являются несulfатированными полисахаридами, образованными, главным образом, остатками D-галактурановой кислоты, присутствующими во всех высших растениях, особенно фруктах. Взаимодействие пектина с клетками сильно зависит от конкретных структурных характеристик используемой макромолекулы (степени метилэтерификации, ацетилирования и нейтральных боковых цепей рамногалактуронана I или рамногалактуронана II). В наших экспериментах пектин сам по себе не влиял на спонтанную, но концентрационно-зависимым образом ингибировал как АДФ-, так и тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов, что согласуется с результатами работы [48], авторы которой выявили антикоагулянтную и антитромботическую активность двух полисахаридов с различной молекулярной массой, полученных из лимонного пектина, как *in vitro*, так и *in vivo*.

Хондроитинсульфат является типичным гликозаминогликаном, который представляет собой линейный полисахарид, структура которого основана на sulfатированных (1–3)- β -N-ацетил-D-галактозамине и (1–4)- β -глюкуроновой кислоте [49]. В ряде работ сообщается об антикоагулянтном действии хондроитинсульфата [50, 51]. Что касается регуляции функций тромбоцитов, то в работе [52] было описано, что хондроитин-4-сульфат ингибирует агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ, это согласуется с полученными нами данными, указывающими на способность хондроитинсульфата концентрационно-зависимым образом препятствовать агонист-индуцированной агрегации тромбоцитов. Данный эффект может быть обусловлен способностью хондроитинсульфата связывать ионы Ca^{2+} [53].

Муцины представляют собой сильно гликозилированные амфифильные гликопротеины с молекулярной массой до 20 МДа. В наших исследованиях было выявлено, что муцин инициирует агрегацию изолированных тромбоцитов, это согласуется с данными работ [54, 55], авторами которых было показано, что белок муцинового ряда подоплани напрямую взаимодействует с CLEC-2, тем самым способствуя агрегации и активации тромбоцитов. Неспособность муцина вызывать агрегацию тромбоцитов в ОТП может быть обусловлена конкуренцией муцина с другими гликопротеинами плазмы крови за лектино-подобный рецептор CLEC-2 на мембране тромбоцитов. Кроме того, в наших экспериментах в ОТП муцин концентрационно-зависимым образом ингибировал АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов.

В настоящей работе показано, что высокомолекулярный декстрансульфат (молекулярная масса 500 кДа) инициирует агрегацию тромбоцитов в плазме, это согласуется с результатами авторов работы [56], в которой было показано, что такой декстрансульфат индуцирует активацию рецептора фибриногена ($\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$) посредством передачи сигналов CLEC-2/SYK и посредством SYK-независимого SFK/PI3K/АКТ-зависимого тирозинкиназного пути с изначальным связыванием с рецептором PEAR-1 на тромбоцитах человека. Отсутствие аналогичного эффекта на изолированных тромбоцитах

может быть обусловлено превалированием Ca^{2+} -связывающей способности декстран-сульфата [57] над рецептор-опосредованной активацией тромбоцитов.

Таким образом, можно заключить, что поливалентная природа биополимеров в сочетании с их сложной гетерогенной структурой, обуславливающей множественные белковые взаимодействия и сложные механизмы активации тромбоцитов, приводит к необходимости изучения каждого конкретно используемого в эксперименте полисахарида и белка на активацию/ингибирование функциональных ответов тромбоцитов.

При исследовании влияния гибридных микрочастиц ватерита на агрегацию тромбоцитов было выявлено, что функционализированные фукоиданом или гепарином частицы вызывали сильную агрегацию клеток, что, по всей видимости, обусловлено выявленными нами агрегантными эффектами самих полисахаридов. Интересно отметить, что гибридные микрочастицы ватерита с муцином не вызывали агрегацию изолированных тромбоцитов несмотря на то, что сам гликопротеин является стимулятором агрегации изолированных клеток. Данный факт, вероятно, обусловлен включением участков молекул, связывающихся с рецепторами на мембране тромбоцитов, вглубь гибридных микрочастиц ватерита. Однако при этом такие гибридные микрочастицы сохраняли способность самого муцина ингибировать АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в плазме. Также интересно отметить, что хондроитинсульфат в составе микрочастиц ватерита терял способность препятствовать агонист-индуцированной агрегации тромбоцитов. Гибридные микрочастицы ватерита с пектином, подобно самому пектину, эффективно ингибировали как тромбин- так и АДФ-индуцированную агрегацию клеток.

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что для разработки средств доставки на основе ватерита с целью коррекции геморрагических состояний перспективным является использование гибридных микрочастиц ватерита с гепарином или фукоиданом (для агрегантных эффектов). В то же время для антиагрегантных эффектов наиболее подходящим полисахаридом для включения в микрочастицы ватерита является пектин. Микрочастицы ватерита, функционализированные хондроитинсульфатом, являются нейтральными в отношении тромбоцитов.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (И. В. Г. и О. М. П.), сбор данных (Д. В. Г., Н. Г. Б., Д. В. М., А. В. С.), обработка данных (Д. В. Г.), написание и редактирование манускрипта (Д. В. Г., Е. В. М., М. А. М., О. М. П., А. В. С., И. В. Г.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств совместного гранта Российского научного фонда (проект № 23–45–10026) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Б23РНФ-093). Получение микрочастиц ватерита проведено при частичной поддержке темы 121041500039–8 МГУ им. М.В. Ломоносова. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Они также были одобрены Комиссией по этике Республиканского научно-практического центра трансфузиологии и медицинских биотехнологий Министерства здравоохранения Республики Беларусь, протокол № 1 от 10.04.2022 г.

Каждый участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Trushina DB, Borodina TN, Belyakov S, Antipina MN* (2022) Calcium carbonate vaterite particles for drug delivery: Advances and challenges. *Mater Today Adv* 14: 100214. <https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2022.100214>
2. *Cavallaro G, Lazzara G, Fakhruddin R* (2018) Mesoporous inorganic nanoscale particles for drug adsorption and controlled release. *Ther Deliv* 9: 287–301. <https://doi.org/10.4155/tde-2017-0120>
3. *Vikulina A, Voronin DV, Fakhruddin RF, Vinokurov VA, Volodkin D* (2020) Naturally derived nano- and micro- drug delivery vehicles: halloysite, vaterite and nanocellulose. *New J Chem* 44: 5638–5655. <https://doi.org/10.1039/C9NJ06470B>
4. *Konopacka-Łyskawa D, Czaplicka N, Łapiński M, Kościelska B, Bray R* (2020) Precipitation and transformation of vaterite calcium carbonate in the presence of some organic solvents. *Materials (Basel)* 13: 2742. <https://doi.org/10.3390/ma13122742>
5. *Kralj D, Brečević L, Kontrec J* (1997) Vaterite growth and dissolution in aqueous solution III. Kinetics of transformation. *J Cryst Growth* 177: 248–257. [https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(96\)01128-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(96)01128-1)
6. *Svenskaya YI, Genina EA, Parakhonskiy BV, Lengert EV, Talnikova EE, Terentyuk GS, Utz SR, Gorin DA, Tuchin VV, Sukhorukov GB* (2019) A simple non-invasive approach toward efficient transdermal drug delivery based on biodegradable particulate system. *ACS Appl Mater Interfaces* 11: 17270–17282. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b04305>
7. *Svenskaya Y, Parakhonskiy B, Haase A, Atkin V, Lukyanets E, Gorin D, Antolini R* (2013) Anticancer drug delivery system based on calcium carbonate particles loaded with a photosensitizer. *Biophys Chem* 182: 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2013.07.006>
8. *Sheng Han Y, Hadiko G, Fuji M, Takahashi M* (2006) Crystallization and transformation of vaterite at controlled pH. *J Cryst Growth* 289: 269–274. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2005.11.011>
9. *Parakhonskiy B, Tessarolo F, Haase A, Antolini R* (2012) Dependence of sub-micron vaterite container release properties on pH and ionic strength of the surrounding solution. *Adv Sci Technol* 86: 81–85. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AST.86.81>
10. *Wang X, Kong R, Pan X, Xu H, Xia D, Shan H, Lu JR* (2009) Role of ovalbumin in the stabilization of metastable vaterite in calcium carbonate biomineralization. *J Phys Chem B* 113: 8975–8982. <https://doi.org/10.1021/jp810281f>
11. *Katsifaras A, Spanos N* (1999) Effect of inorganic phosphate ions on the spontaneous precipitation of vaterite and on the transformation of vaterite to calcite. *J Cryst Growth* 204: 183–190. [https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(99\)00174-8](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(99)00174-8)
12. *Al Omari MM, Rashid IS, Qinna NA, Jaber AM, Badwan AA* (2016) Calcium carbonate. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol* 41: 31–132. <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2015.11.003>
13. *Choukrani G, Freile JA, Avtenyuk NU, Wan W, Zimmermann K, Bremer E, Dähne L* (2021) High loading efficiency and controlled release of bioactive immunotherapeutic proteins using vaterite nanoparticles. *Part Part Syst Charact* 38: 2100012. <https://doi.org/10.1002/ppsc.202100012>
14. *Dong Z, Feng L, Zhu W, Sun X, Gao M, Zhao H, Chao Y, Liu Z* (2016) CaCO₃ nanoparticles as an ultra-sensitive tumor-pH-responsive nanoplatfrom enabling real-time drug release monitoring and cancer combination therapy. *Biomaterials* 110: 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.09.025>
15. *Mayorga IC, Astilleros JM, Fernández-Díaz L* (2019) Precipitation of CaCO₃ polymorphs from aqueous solutions: the role of pH and sulphate groups. *Minerals* 9: 1–16. <https://doi.org/10.3390/min9030178>

16. *Balabushevich NG, Kovalenko EA, Le-Deygen IM, Filatova LY, Volodkin D, Vikulina AS* (2019) Hybrid CaCO₃-mucin crystals: effective approach for loading and controlled release of cationic drugs. *Mater Des* 182: 108020.
<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2019.108020>
17. *Balabushevich NG, Lopez de Guereñu AV, Feoktistova NA, Volodkin D* (2015) Protein loading into porous CaCO₃ microspheres: adsorption equilibrium and bioactivity retention. *Phys Chem Chem Phys* 17: 2523–2530.
<https://doi.org/10.1039/C4CP04567>
18. *Sudareva N, Suvorova O, Saprykina N, Smirnova N, Bel'tyukov P, Petunov S, Radilov A, Vilesov A* (2018) Two-level delivery systems based on CaCO₃ cores for oral administration of therapeutic peptides. *J Microencapsul* 35: 619–634.
<https://doi.org/10.1080/02652048.2018.1559247>
19. *Shi P, Luo S, Voit B, Appelhans D, Zan X* (2018) A facile and efficient strategy to encapsulate the model basic protein lysozyme into porous CaCO₃. *J Mater Chem B* 6: 4205–4215.
<https://doi.org/10.1039/c8tb00312b>
20. *Balabushevich NG, Sholina EA, Mikhalechik EV, Filatova LY, Vikulina AS, Volodkin D* (2018) Self-assembled mucin-containing microcarriers via hard templating on CaCO₃ crystals. *Micromachines* 9: 1–16.
<https://doi.org/10.3390/mi9060307>
21. *Sudareva NN, Suvorova OM, Suslov DN, Galibin OV, Vilesov AD* (2021) Dextran sulfate coated CaCO₃ vaterites as the systems for regional administration of doxorubicin to rats. *Cell Ther Transplant* 10: 71–77.
<https://doi.org/10.18620/ctt-1866-8836-2021-10-3-4-71-77>
22. *Trushina DB, Bukreeva TV, Kovalchuk MV, Antipina MN* (2014) CaCO₃ vaterite microparticles for biomedical and personal care applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 45: 644–658.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.04.050>
23. *Wang C, He C, Tong Z, Liu X, Ren B, Zeng F* (2006) Combination of adsorption by porous CaCO₃ microparticles and encapsulation by polyelectrolyte multilayer films for sustained drug delivery. *Int J Pharm* 308: 160–167.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.11.004>
24. *Saveleva MS, Ivanov AN, Chibrikova JA, Abalymov AA, Surmeneva MA, Surmenev RA, Parakhonskiy BV, Lomova MV, Skirtach AG, Norkin IA* (2021) Osteogenic capability of vaterite-coated nonwoven polycaprolactone scaffolds for in vivo bone tissue regeneration. *Macromol Biosci* 21: 2100266.
<https://doi.org/10.1002/mabi.202100266>
25. *Dizaj SM, Barzegar-Jalali M, Hossein Zarrintan M, Adibkia K, Lofipour F* (2015) Calcium carbonate nanoparticles; potential in bone and tooth disorders. *Pharm Sci* 20: 175–182.
<https://doi.org/10.5681/PS.2015.008>
26. *An S* (2019) The emerging role of extracellular Ca²⁺ in osteo/odontogenic differentiation and the involvement of intracellular Ca²⁺ signaling: from osteoblastic cells to dental pulp cells and odontoblasts. *J Cell Physiol* 234: 2169–2193.
<https://doi.org/10.1002/jcp.27068>
27. *Abalymov A, Lengert E, Van der Meeren L, Saveleva M, Ivanova A, Douglas TEL, Skirtach AG, Volodkin D, Parakhonskiy B* (2022) The influence of Ca/Mg ratio on autogelation of hydrogel biomaterials with bioceramic compounds. *Biomater Adv* 133: 112632.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112632>
28. *Sergeeva A, Vikulina AS, Volodkin D* (2019) Porous alginate scaffolds assembled using vaterite CaCO₃ crystals. *Micromachines* (Basel) 10: 357.
<https://doi.org/10.3390/mi10060357>
29. *Niu YQ, Liu JH, Aymonier C, Fermari S, Kralj D, Falini G, Zhou CH* (2022) Calcium carbonate: controlled synthesis, surface functionalization, and nanostructured materials. *Chem Soc Rev* 51: 7883–7943.
<https://doi.org/10.1039/d1cs00519g>
30. *Yu Q, Su B, Zhao W, Zhao C* (2023) Janus self-propelled chitosan-based hydrogel spheres for rapid bleeding control. *Adv Sci (Weinh)* 10: 2205989.
<https://doi.org/10.1002/advs.202205989>
31. *Li Q, Hu E, Yu K, Xie R, Lu F, Lu B, Bao R, Zhao T, Dai F, Lan G* (2020) Self-propelling janus particles for hemostasis in perforating and irregular wounds with massive hemorrhage. *Adv Funct Mater* 30: 2004153.
<https://doi.org/10.1002/adfm.202004153>
32. *Baylis JR, Yeon JH, Thomson MH, Kazerooni A, Wang X, St John AE, Lim EB, Chien D, Lee A, Zhang JQ, Piret JM, Machan LS, Burke TF, White NJ, Kastrop CJ* (2015) Self-propelled particles that transport cargo through flowing blood and halt hemorrhage. *Sci Adv* 1: 1500379.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.1500379>

33. *Campbell J, Ferreira AM, Bowker L, Hunt J, Volodkin D, Vikulina A* (2022) Dextran and its derivatives: biopolymer additives for the modulation of vaterite CaCO₃ crystal morphology and adhesion to cells. *Advan Mater Interfac* 9: 2201196.
<https://doi.org/10.1002/admi.202201196>
34. *Mikhailchik EV, Basyreva LY, Gusev SA, Panasenکو OM, Klinov DV, Barinov NA, Morozova OV, Moscalets AP, Maltseva LN, Filatova LY, Pronkin EA, Bespyatykh JA, Balabushevich NG* (2022) Activation of neutrophils by mucin-vaterite microparticles. *Int J Mol Sci* 23: 10579.
<https://doi.org/10.3390/ijms231810579>
35. *Mikhailchik EV, Maltseva LN, Firova RK, Murina MA, Gorudko IV, Grigorieva DV, Ivanov VA, Obratsova EA, Klinov DV, Shmeleva EV, Gusev SA, Panasenکو OM, Sokolov AV, Gorbunov NP, Filatova LY, Balabushevich NG* (2023) Incorporation of pectin into vaterite microparticles prevented effects of adsorbed mucin on neutrophil activation. *Int J Mol Sci* 24: 15927.
<https://doi.org/10.3390/ijms242115927>
36. *Kotova YN, Podoplelova NA, Obydennyi SI, Kostanova EA, Ryabykh AA, Demyanova AS, Biriukova MI, Rosenfeld MA, Sokolov AV, Chambost H, Kumsکova MA, Ataullakhanov FI, Alessi MC, Panteleev MA* (2019) Binding of coagulation factor XIII zymogen to activated platelet subpopulations: roles of integrin α IIb β 3 and fibrinogen. *Thromb Haemost* 119: 906–915.
<https://doi.org/10.1055/s-0039-1683912>
37. *Gorudko IV, Sokolov AV, Shamova EV, Grudinina NA, Drozd ES, Shishlo LM, Grigorieva DV, Bushuk SB, Bushuk BA, Chizhik SA, Cherenkevich SN, Vasilyev VB, Panasenکو OM* (2013) Myeloperoxidase modulates human platelet aggregation via actin cytoskeleton reorganization and store-operated calcium entry. *Biol Open* 2: 916–923.
<https://doi.org/10.1242/bio.20135314>
38. *Lin Z, Tan X, Zhang Y, Li F, Luo P, Liu H* (2020) Molecular targets and related biologic activities of fucoidan: a review. *Mar Drugs* 18: 376.
<https://doi.org/10.3390/md18080376>
39. *Fitton JH* (2011) Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers. *Mar Drugs* 9: 1731–1760.
<https://doi.org/10.3390/md9101731>
40. *Fitton JH, Stringer DN, Karpiniec SS* (2015) Therapies from fucoidan: an update. *Mar Drugs* 13: 5920–5946.
<https://doi.org/10.3390/md13095920>
41. *Dubashynskaya NV, Gasilova ER, Skorik YA* (2023) Nano-sized fucoidan interpolyelectrolyte complexes: recent advances in design and prospects for biomedical applications. *Int J Mol Sci* 24: 2615.
<https://doi.org/10.3390/ijms24032615>
42. *Manne BK, Getz TM, Hughes CE, Alshehri O, Dangelmaier C, Naik UP, Watson SP, Kunapuli SP* (2013) Fucoidan is a novel platelet agonist for the C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2). *J Biol Chem* 288: 7717–7726.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.424473>
43. *Qiu M, Huang S, Luo C, Wu Z, Liang B, Huang H, Ci Z, Zhang D, Han L, Lin J* (2021) Pharmacological and clinical application of heparin progress: an essential drug for modern medicine. *Biomed Pharmacother* 139: 111561.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111561>
44. *Kardeby C, Evans A, Campos J, Al-Wahaibi AM, Smith CW, Slater A, Martin EM, Severin S, Brill A, Pejler G, Sun Y, Watson SP* (2023) Heparin and heparin proteoglycan-mimetics activate platelets via PEAR1 and PI3K β . *J Thromb Haemost* 21: 101–116.
<https://doi.org/10.1016/j.jtha.2022.10.008>
45. *Chong BH, Ismail F* (1989) The mechanism of heparin-induced platelet aggregation. *Eur J Haematol* 43: 245–251.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1989.tb00290.x>
46. *Ahmed I, Majeed A, Powell R* (2007) Heparin induced thrombocytopenia: diagnosis and management update. *Postgrad Med J* 83: 575–582.
<https://doi.org/10.1136/pgmj.2007.059188>
47. *Brodard J, Alberio L, Angelillo-Scherer A, Nagler M* (2020) Accuracy of heparin-induced platelet aggregation test for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Res* 185: 27–30.
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.11.004>
48. *Cipriani TR, Gracher AH, de Souza LM, Fonseca RJ, Belmiro CL, Gorin PA, Sasaki GL, Iacomini M* (2009) Influence of molecular weight of chemically sulfated citrus pectin fractions on their antithrombotic and bleeding effects. *Thromb Haemost* 101: 860–866.
<https://doi.org/10.1160/TH08-08-0556>

49. Shen Q, Guo Y, Wang K, Zhang C, Ma Y (2023) A review of chondroitin sulfate's preparation, properties, functions, and applications. *Molecules* 28: 7093.
<https://doi.org/10.3390/molecules28207093>
50. Sakai T, Kyogashima M, Kariya Y, Urano T, Takada Y, Takada A (2000) Importance of GlcUA β 1–3GalNAc(4S,6S) in chondroitin sulfate E for t-PA- and u-PA-mediated Glu-plasminogen activation. *Thromb Res* 100: 557–565.
[https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(00\)00365-0](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(00)00365-0)
51. Maruyama T, Toida T, Imanari T, Yu G, Linhardt RJ (1998) Conformational changes and anticoagulant activity of chondroitin sulfate following its O-sulfonation. *Carbohydr Res* 306: 35–43.
[https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)10060-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)10060-X)
52. Nader HB (1991) Characterization of a heparan sulfate and a peculiar chondroitin 4-sulfate proteoglycan from platelets. Inhibition of the aggregation process by platelet chondroitin sulfate proteoglycan. *J Biol Chem* 266: 10518–10523.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)99255-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99255-0)
53. Shen Q, Guo Y, Wang K, Zhang C, Ma Y (2023) A review of chondroitin sulfate's preparation, properties, functions, and applications. *Molecules* 28: 7093.
<https://doi.org/10.3390/molecules28207093>
54. Strassenburg W, Józwicki J, Durślewicz J, Kuffel B, Kulczyk MP, Kowalewski A, Grzanka D, Drewa T, Adamowicz J (2022) Tumor cell-induced platelet aggregation as an emerging therapeutic target for cancer therapy. *Front Oncol* 12: 909767.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2022.909767>
55. Kato Y, Kaneko MK, Kunita A, Ito H, Kameyama A, Ogasawara S, Matsuura N, Hasegawa Y, Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ozaki Y, Narimatsu H (2008) Molecular analysis of the pathophysiological binding of the platelet aggregation-inducing factor podoplanin to the C-type lectin-like receptor CLEC-2. *Cancer Sci* 99: 54–61.
<https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00634.x>
56. Vandenbriele C, Sun Y, Criel M, Chudts K, Van Kerckhoven S, Izzi B, Vanassche T, Verhamme P, Hoylaerts MF (2016) Dextran sulfate triggers platelet aggregation via direct activation of PEAR1. *Platelets* 27: 365–372.
<https://doi.org/10.3109/09537104.2015.1111321>
57. Hlady V (1984) Adsorption of dextran and dextran sulfate on precipitated calcium oxalate monohydrate. *J Colloid and Interface Sci* 98: 373–384.
[https://doi.org/10.1016/0021-9797\(84\)90161-9](https://doi.org/10.1016/0021-9797(84)90161-9)

Effect of biopolymers and functionalized by them vaterite microparticles on platelet aggregation

D. V. Grigorieva^{a, #}, E. V. Mikhailchik^b, N. G. Balabushevich^{b, c}, D. V. Mosievich^c,
M. A. Murina^b, O. M. Panasenko^b, A. V. Sokolov^{b, d}, and I. V. Gorudko^a

^aBelarusian State University, Minsk, Belarus

^bLopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical
Biological Agency, Moscow, Russia

^cLomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

^dnstitute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

*e-mail: dargr@tut.by

Vaterite microparticles, metastable form of calcium carbonate, are promising forms of delivery of medicinal compounds. For more efficient delivery of target molecules (increased incorporation and retention), vaterite microparticles must be functionalized with biopolymers. In this article the effect of polysaccharides, mucin and vaterite microparticles, as well as hybrid vaterite microparticles with the above-mentioned biopolymers was studied on platelet aggregation. It was found that fucoidan, heparin and dextran sulfate (when added to platelet-rich plasma) and mucin (when added to isolated platelets) initiated cell aggregation. Pectin and chondroitin sulfate inhibited ADP- and thrombin-induced aggregation in a dose-dependent manner, mucin suppressed ADP-induced, and dextran

sulfate suppressed thrombin-induced platelet aggregation. Vaterite microparticles at a concentration of 100–1000 $\mu\text{g/ml}$ did not affect the aggregation of isolated platelets, but caused 10–15% cell aggregation in plasma; at the same time, at a concentration of 1000 $\mu\text{g/ml}$ vaterite microparticles prevented agonist-induced cell aggregation by ~30%. It has been established that hybrid vaterite microparticles with fucoidan or heparin, when added both to platelet-rich plasma and to isolated cells, are capable to initiate platelet aggregation. Vaterite microparticles functionalized with pectin or chondroitin sulfate had no effect on spontaneous cell aggregation, and did not affect (with chondroitin sulfate) or inhibit (with pectin) agonist-induced platelet aggregation. Thus, the use of hybrid vaterite microparticles with pectin or fucoidan/heparin may be promising for the delivery of drugs aimed at modulating (inhibition with pectin or activation with fucoidan/heparin) the platelet component of hemostasis.

Keywords: platelet, aggregation, vaterite microparticle, polysaccharide, mucin, adenosine diphosphate, thrombin