

**ВАСИЛИЙ ВАЛЕНТИНОВИЧ ВИНОГРАДОВ**  
аспирант кафедры общей и факультетской хирургии Медицинского института, Петрозаводский государственный университет (Петрозаводск, Российская Федерация)  
*ortoped.ivanovo@rambler.ru*

**ИВАН ПЕТРОВИЧ ДУДАНОВ**  
доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой общей и факультетской хирургии Медицинского института, Петрозаводский государственный университет (Петрозаводск, Российская Федерация)  
*ipdudanov@gmail.com*

## ИММОБИЛИЗАЦИЯ АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА В ПОРИСТУЮ МАТРИЦУ ОКСИДА АЛЮМИНИЯ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ТРОМБОЛИТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Основным препятствием при разработке новых тромболитических систем на основе ферментов является их низкая стабильность и короткий период полувыведения (не превышающий, как правило, 2–6 мин.), который требует введения их в больших дозах для достижения необходимого эффекта и, как следствие, неизбежно приводит к значительным геморрагическим осложнениям. В данной работе мы представляем новый подход к решению этой проблемы путем разработки нового семейства парентеральных композитов для тромболизиса. Иммобилизация активатора плазминогена в пористую матрицу на основе оксида алюминия значительно увеличивает стабильность тромболитического фермента, усиливает его термическую стабильность и маскирует от иммунной системы организма.

Ключевые слова: оксид алюминия, золь-гель синтез, тромболизис, активатор плазминогена

### ВВЕДЕНИЕ

Тромбоз является симптомом перекрывания русла кровяного потока вследствие образования тромба в кровеносном сосуде. Тромболитическая терапия, которая используется для растворения сгустков крови, в основном имеет дело с введением соответствующих ферментов, таких как стрептокиназа, урокиназа и активатор плазминогена тканевого типа (ТАП) [15]. Тем не менее эти тромболитические препараты неизбежно ведут к риску геморрагических осложнений из-за их неспецифической активации [5], что существенно ограничивает их реальное применение в терапии [8]. Высокая стоимость и быстрая потеря активности тромболитических ферментов стимулируют разработку новых видов систем, где фермент будет иммобилизирован в биологически инертную матрицу, обеспечивающую высокую стабильность, подход субстрата и сохранение активности.

Ранее нами были разработаны методики золь-гель синтеза высокочистых нанокристаллических оксидов при помощи ультразвука [11], [14], предложена новая концепция для создания парентеральных золь-гель материалов на основе оксида алюминия [11]. В работе [13] были использованы три различных терапевтических фермента для изучения их стабильности в иммобилизованном состоянии. Результаты показывают, что введение ферментов в матрицу приводит к сдвигу температуры денатурации на 30–50 °C. Кроме того, было

установлено, что матрица оксида алюминия защищает не только от тепловой денатурации, но в определенном диапазоне температур существенно повышает активность ферментов с ростом температуры, тогда как свободные ферменты при этих температурах полностью теряют свою активность.

В данной работе мы показали, что тканевый активатор плазминогена может быть успешно иммобилизирован в матрицу из оксида алюминия с сохранением тромболитической активности и повышением термической стабильности. Несмотря на то что поведение большинства ферментов уже исследовалось в золь-гель матрицах [1], [2], [12], активность тромболитических ферментов в иммобилизованном состоянии до сих пор не была исследована. Это обусловлено тем, что при проведении химической реакции реагирующему веществу необходимо пройти через сеть микропор (характерную для большинства золь-гель матриц) для достижения каталитического центра. В том случае когда один из реагентов – профермент (плазминоген), практически невозможно достичь прямой диффузии внутри пор размером менее 3 нм. Поэтому необходимо обеспечить доставку высокомолекулярной молекулы к каталитическому реакционному центру через поры большего диаметра. В данной работе получены композиты с бимодальной пористой структурой и изучены механизмы действия и активации иммобилизованных тромболитических ферментов *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. ХИМИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

Изопропоксид алюминия, плазминоген из бычьей плазмы крови (ПГ, кат. № P9156), фибриноген из бычьей плазмы крови (ФГ, кат. № F8630), тромбин из бычьей плазмы крови (ТБ, кат. № T7513), тканевый активатор плазминогена (ТАП, кат. № T5451) были получены от компании Sigma-Aldrich. Глициновый буфер (рН = 7,4) был получен из растворов глицина (0,05 М; Sigma-Aldrich) при добавлении определенного объема 1,0 М NaOH.

**Золь-гель синтез оксида алюминия.** Золь оксида алюминия получен по методике, изложенной в работе [11]: 2,2 г Al (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O)<sub>3</sub> добавили к 50 мл десорбированной воды при 90 °C. При этом образуется белый студенистый осадок. Перед обработкой ультразвуком осадок выдерживали при 90 °C и интенсивном перемешивании в течение 15 мин. для формирования наночастиц бемита и испарения изопропанола, образующегося в процессе гидролиза. Конечную суспензию подвергали ультразвуковой обработке в течение 2 ч. Спустя 2 ч. образовался вязкий золь. Полученный золь охлаждали до комнатной температуры. Высушенная матрица имела площадь поверхности 153 м<sup>2</sup>/г, объем пор 0,097 см<sup>3</sup>/г и средний размер пор ~2,5 нм.

**Процедура иммобилизации ТАП в оксид алюминия.** Для иммобилизации ТАП смесь, состоящую из 50 мкл буферного раствора глицина-NaOH (рН 7,4) и 150 мкл свежеприготовленного золя оксида алюминия, помещали в кювету, а затем добавляли 20 мкл ТАП (500 У/мл). Через десять минут золь помещали в вакуумный эксикатор при комнатной температуре на 24 ч. Для удаления адсорбированных белков ТАП@оксид алюминия был промыт внутри конечной полистирольной кюветы раствором глицина объемом 1,0 мл (рН 7,4). Полная иммобилизация фермента подтверждалась отсутствием активности промывочного раствора.

**Ферментативная активность.** После промывки 1,0 мл раствора глицина (рН 7,4) биоактивный гибрид оставляли на инкубацию при 37 °C в течение 30 мин. Затем промывочный раствор был заменен смесью 1,0 мл раствора бычьего фибриногена с концентрацией 5 мг/мл и 0,5 мл раствора бычьего плазминогена (1,2 У/мл) с последующим добавлением 0,5 мл раствора тромбина (50 У/мл) в глициновом буфере (рН 7,4). После образования сгустка ферментативную активность измеряли спектроскопически путем поглощения при длине волны 340 нм и температуре 37 °C. Соответствующая кривая образования и лизиса сгустка (КОЛС) показана на рис. 1. Растущая часть кривой соответствует образованию фибринового сгустка, а нисходящая – его лизису. Промывочный раствор также тестировали на ферментативную активность пу-

тем помещения 500 мкл раствора в кювету при последующем введении тромбообразующего раствора. Чтобы скомпенсировать реакционную способность иммобилизованных ферментов, концентрация свободных ферментов была снижена в 10 раз. Кинетические кривые были интерпретированы в соответствии с указаниями работы [10], при этом в качестве стандарта принималась активность свободного ТАП.

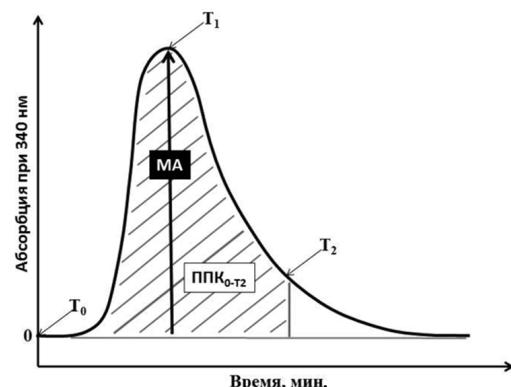


Рис. 1. Кривая образования и лизиса сгустка. Измерения включают максимальную амплитуду (МА), время до максимальной абсорбции ( $T_1$ ), завершение первого этапа снижения оптической плотности ( $T_2$ ) и площадь под кривой (ППК), из которой можно рассчитать индекс коагуляции (ИК) и фибринолитический коэффициент (ФК)

Кривая образуется во время анализа, начиная при нулевых значениях показателя поглощения (см. рис. 1) с последующим постепенным повышением оптической плотности до точки МА (достигается при  $T_1$ ). Первая стадия снижения оптической плотности заканчивается при  $T_2$ , в точке, в которой наклон снижения оптической плотности меняется на 10 мОП/мин и завершается при возвращении оптической плотности к нулевой отметке. Параметры МА,  $T_1$  и  $T_2$  получаются непосредственно из данных по оптической плотности. Используя ППК на протяжении начального периода анализа до  $T_2$ , можно рассчитать ИК, который связывает ППК образца и стандарта (активность свободного ТАП взята в качестве стандарта), а именно:

$$ИК = \frac{(ППК_{0-T_2})_{образец}}{(ППК_{0-T_2})_{стандарт}} \times 100.$$

Также были измерены ФК. Они могут быть вычислены по соотношению времени завершения первого этапа снижения оптической плотности ( $T_2$ ) и времени до достижения максимального поглощения ( $T_1$ ) для соответствующего образца по сравнению со стандартом (с поправкой на различие в максимальном поглощении) следующим образом:

$$\Phi K = \frac{T_2 / T_{1\text{образец}}}{T_2 / T_{1\text{стандарт}}} \times \frac{MA_{\text{стандарт}}}{MA_{\text{образец}}} \times 100.$$

В данной работе анализ КОЛС иммобилизованного ТАП анализировали по МА,  $T_1$ ,  $T_2$ , ИК и ФК с использованием указанных выше расчетов.

**Стабильность композитного материала в модельной системе крови.** Для проверки стабильности синтезированного композита в реальной системе крови был использован концентрированный раствор Рингера. В растворе Рингера соотношение концентраций солей аналогично крови. Для этого пластиковые кюветы с композитом обрабатывались раствором Рингера и выдерживались при перемешивании в течение 30 дней. Активность иммобилизованного ТАП после испытания была сопоставлена с исходной активностью. Наблюдаемое снижение активности составило лишь 2,5 %.

**Методика определения свойств.** Удельная площадь поверхности, объем пор и распределение пор по размерам определяли методом адсорбции-десорбции азота при 77 К (Quantachrome Nova 1200, серия E). Площади поверхности были рассчитаны с использованием уравнения БЭТ. Методом ВЖН были рассчитаны объемы пор и распределение пор по размерам. Распределение микропор по размерам рассчитывалось с использованием метода Дубинина – Астахова (ДА). Перед анализом образец дегазировали в течение 24 ч. при комнатной температуре. Кристаллическая фаза и кристалличность образцов были исследованы методом рентгеновской дифракции (Bruker D8 Advance) с использованием излучения Cu-K $\alpha$  с длиной волны  $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ , образцы сканировали по  $2\theta$  в диапазоне 4–75° со скоростью 0,5 градуса в минуту. Спектральный анализ ферментативной активности проводили с использованием спектрофотометра PG Instruments T80. При использовании сканирующей электронной микроскопии (СЭМ, электронный микроскоп Magellan 400L сверхвысокого разрешения) конечную суспензию захваченного фермента наносили на кремниевую подложку и полностью высушивали в вакууме. Образцы для просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) были получены путем диспергирования небольшой пробы в этаноле с образованием гомогенной суспензии. Затем каплю суспензии наносили на медную сетку, покрытую углеродом, для анализа ПЭМ (FEI Tecnai G2 F20 при рабочем напряжении 200 кВ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Следует отметить, что разработанная методика получения нанокристаллического золя AlOOH в водном растворе при ультразвуковом облучении подразумевает использование почти нейтральных значений pH, которые являются комфортными для биомолекул и соответствуют диапазону, где может быть достигнута полная иммобилизация.

Среди шести кристаллических фаз оксида алюминия биосовместимой формой, применяемой в качестве адьюванта, является бемит/псевдобемит. Чтобы идентифицировать кристаллическую фазу, мы использовали метод рентгеновской дифракции. Положение максимумов на рентгенограмме как для индивидуальной матрицы, так и для композита с ТАП соответствует типичной структуре бемита. Анализ размера кристаллитов, проведенный с использованием уравнения Шерера, указывает на присутствие в полученных материалах кристаллитов со средним размером 3–4 нм.

Анализ удельной поверхности и пористости (методом адсорбции азота, с помощью уравнений БЭТ и ВЖН) был проведен в предположении типичной микро- и мезопористости образца (рис. 2). Для композита были получены следующие характеристики: площадь поверхности  $175 \text{ m}^2/\text{г}$ , объем пор  $0,116 \text{ cm}^3/\text{г}$ , размер пор  $<4 \text{ нм}$  с максимумом при 2,2 нм (по методу ДА). Следует предположить, что высвобождение фермента из матрицы оксида алюминия сильно зависит от размера белка и среднего размера пор матрицы. С этой целью опыт по высвобождению ТАП из матрицы оксида алюминия проводили в течение 30 дней в концентрированном растворе Рингера. Снижение активности было незначительным (рис. 3). Это связано с полной иммобилизацией фермента в матрицу на основе оксида алюминия удерживанием его в сетке микро- и мезопор.

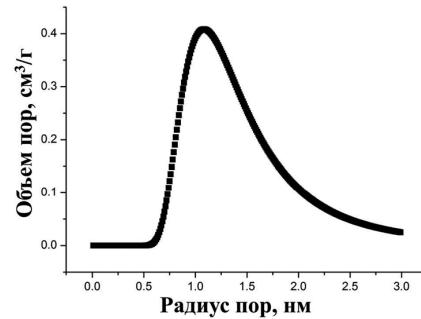


Рис. 2. Распределение пор композита по размерам, рассчитанное с использованием метода Дубинина – Астахова

## Данные анализа КОЛС по методике [10]

	$T_1$ , мин.	$T_2$ , мин.	МА, ОП	ФК, %	ИК, %
Свободный ТАП (стандарт)	1,6	2,4	0,44	100	100
Промывочный раствор	3	0	0,47	0	0
Иммобилизованный ТАП	7,5	15,9	0,54	115	882
Иммобилизованный ТАП после раствора Рингера	7,6	16,9	0,55	119	883

Перед испытаниями были поставлены три вопроса: способен ли иммобилизованный фермент растворить тромб? Каковы параметры

лизиса по сравнению со свободным ферментом? Каков механизм тромболизиса при использовании гетерогенной системы?

Во-первых, на рис. 3 показано, что тромболизис с иммобилизованным ферментом возможен. Данные фибринолитической активности представлены в таблице. Из рис. 3 видно, что время тромбообразования после добавления тромбина составляет около 2 мин. Если тромболизис со свободным ферментом начинается сразу после образования сгустка при достижении максимального поглощения, то промывочный раствор (см. рис. 3) показывает лишь незначительную активность, сравнимую с неферментативным поведением.

Добавление фермента в матрицу приводит к ингибированию фибринолизиса (см. рис. 3). Наблюдается 4,7-кратное ( $T_1$ ) увеличение времени сохранения максимального поглощения. Эта величина характеризует процесс накопления активного плазмина, поскольку лизис сгустка начинается только после того, как концентрация активного фермента достигла определенного значения [6]. Индекс коагуляции также превышает нормальное значение в 8,8 раза. Таким образом, уменьшение скорости активации плазминогена обусловлено диффузией плазминогена через пористую структуру матрицы для достижения каталитических реакционных центров, способных к формированию активаторного комплекса, который постепенно образуется в ходе реакции. Это также подтверждается значительным повышением ФК (на 15 % больше, чем свободный ТАП), что объясняется как уменьшением скорости образования комплекса ТАП – плазминоген, так и снижением количества активированного плазмина. Возможно, в этот период процесс формирования активированного плазминогена начинает ограничиваться количеством функционально активного ТАП и диффузией плазминогена к каталитическим центрам. Необходимо отметить, что в ходе испытания композита в концентрированном растворе Рингера активность практически не изменилась. После 30 дней испытаний активность иммобилизованного ТАП снизилась по сравнению с начальным состоянием лишь на 2,5 %.

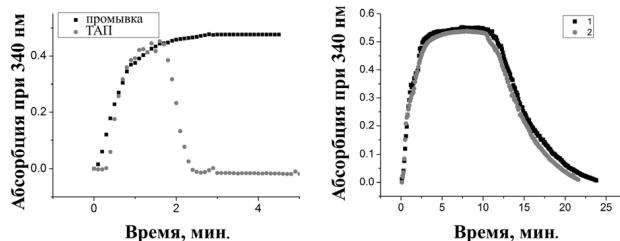


Рис. 3. КОЛС свободного ТАП и промывочного раствора по сравнению с иммобилизованным ТАП (1 – после, 2 – до опыта в растворе Рингера)

Принимая во внимание то, что размер пор для композита составляет около 2 нм и эта величина обеспечивает необходимые условия для захвата фермента внутрь пористой матрицы бемита, можно предположить, что обеспечивать доставку крупных молекул плазминогена к активным центрам фермента будет крайне сложно. Тем не менее наблюдаемая активность иммобилизованного фермента указывает на наличие пор бимодального типа. Чтобы убедиться в этом, образец был исследован методами СЭМ и ПЭМ (рис. 4).

По результатам микроскопии видно, что образец состоит из бемитовых стержней размером около  $2 \times 12$  нм, которые довольно плотно упакованы. В самом деле размер пор в материале не превышает 2–4 нм (рис. 4б), что хорошо согласуется с результатами физической адсорбции азота (см. рис. 2). В то же время отчетливо наблюдается присутствие пор гораздо большего размера ( $> 20$  нм, см. рис. 4а), которые могут обеспечить свободное перемещение больших молекул плазминогена. Таким образом, структура синтезированного композита напоминает муравейник, где каналы большего диаметра постепенно переходят в поры меньшего размера. Так как высвобождение фермента из матрицы практически не наблюдается, разумно предположить, что основная его часть контактирует с внешней средой через поры меньшего диаметра.

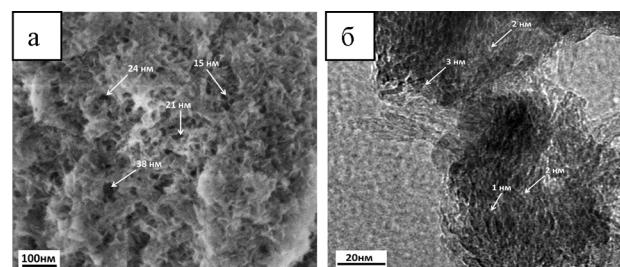


Рис. 4. Изображения СЭМ (а) и ПЭМ (б) для композита. Показано наличие бимодальной мезопористой структуры

## ДАЛЬНЕЙШЕЕ ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В качестве заключения мы хотели бы предложить механизм тромболизиса с использованием иммобилизованного тканевого активатора плазминогена (рис. 5).

Плазмин является основной фибринолитической протеазой (см. рис. 5). Плазминоген (ПГ), циркулирующий в плазме зимоген, может быть преобразован в плазмин с помощью ТАП [4], [6]. Фибрин, главный субстрат плазмина, регулирует собственную деградацию путем связывания на своей поверхности ПГ и ТАП, локализуя и усиливая таким образом образование плазмина. В то время как ТАП является слабым активатором ПГ в отсутствие фибрина, его каталитическая эффективность в активации ПГ усиливается по крайней мере на два порядка в присутствии фибрина [9]. Средство между ТАП и ПГ является низким в отсутствие фибрина, но значительно увеличи-

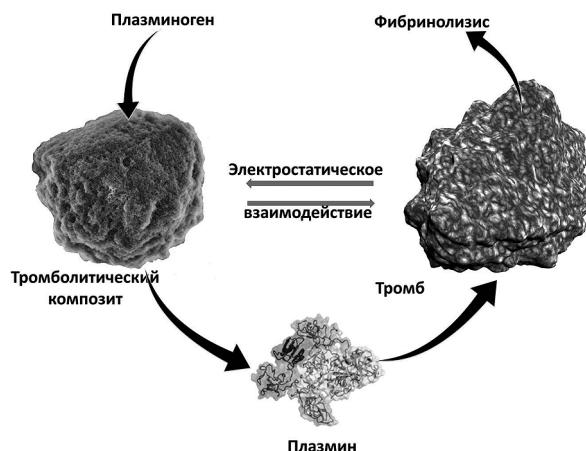


Рис. 5. Схема работы фибринолитической системы с иммобилизованным тканевым активатором плазминогена

вается в его присутствии. В нашем случае роль фибрина в улучшении средства между ТАП и ПГ берет на себя матрица оксида алюминия, которая соединяет их в одной поре. Необходимое электростатическое взаимодействие между отрицательно заряженным фибрином и оксидом алюминия (дзета-потенциал для синтезированного оксида алюминия составляет 32 мВ) является движущей силой для соединения двух компонентов. Чтобы обеспечить образование плазмина, плазмино-

ген должен проникнуть в бемитовую матрицу, содержащую активный ТАП, чего можно легко достичь при наличии пор большего диаметра (около 20 нм). При входе в такой канал плазминоген начинает гидролизоваться функциональными группами ТАП, расположенными в порах меньшего диаметра (менее 4 нм).

Поскольку свободный ТАП может легко ингибироваться [3], еще одной функцией матрицы оксида алюминия является защита ТАП от нежелательного разложения и ингибиования. Зольгель матрицы, как известно, являются идеальными кандидатами для осуществления функции защиты от температуры, химических веществ, растворителей и т. д. [7], [11].

После своего образования плазмин расщепляет фибрин, давая растворимые продукты разложения и карбоксильные концевые остатки лизина. Вследствие диффузационных ограничений образованный плазмин может быть подвержен действию ингибиторов только после выделения из матрицы, что приводит к значительному увеличению времени полураспада плазмина.

Авторы благодарны Центру нанотехнологий в Еврейском университете (г. Иерусалим, Израиль) за помощь в проведении экспериментов сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Avnir D., Braun S., Lev O., Ottolenghi M. Enzymes and Other Proteins Entrapped in Sol-Gel Materials. *Chem. Mater.* 1994. № 6. P. 1605–1614.
- Avnir D., Coradin T., Lev O., Livage J. Recent bio-applications of sol-gel materials. *J. Mater. Chem.* 2006. № 16. P. 1013–1030.
- Bangert K., Johnsen A. H., Christensen U., Thorsen S. Different N-terminal forms of  $\alpha$ 2-plasmin inhibitor in human plasma. *Biochem.* 1993. № 291. P. 623–625.
- Bennett W., Paoni N., Keyt B., Botstein D., Jones A. J. S., Presta L., Wurm F. M., Zoller M. J. High resolution analysis of functional determinants on human tissue-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 1991. № 266. P. 5191–5201.
- Bi F., Zhang J., Su Y., Tang Y. C., and Liu J. N. Chemical conjugation of urokinase to magnetic nanoparticles for targeted thrombolysis. *Biomaterials.* 2009. № 30. P. 5125–5130.
- Ceserman-Maus G., Hajjar K. A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British Journal of Haematology.* 2005. № 129. P. 307–321.
- Frenkel-Muller ad H., Avnir D. Sol-gel materials as efficient enzyme protectors: preserving the activity of phosphatases under extreme pH conditions. *J. Am. Chem. Soc.* 2005. № 127. P. 8077–8081.
- Hacke W., Kaste M., Fieschi C., Kummer R. V., Davalos A., Meier D., Larrue V., Bluhmki E., Davis S., and Donnan G. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke. Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. *Lancet.* 1998. № 352. P. 1245–1251.
- Lijnen H. R., Collen D. Strategies for the improvement of thrombolytic agents. *Thromb Haemostas.* 1991. № 66. P. 88–110.
- Goldenberg N. A., Hathaway W. E., Jacobson L., Manco-Johnson M. J. A new global assay of coagulation and fibrinolysis. *Thrombosis Research.* 2005. № 116. P. 345–356.
- Rutenberg A., Vinogradov V., Avnir D. Synthesis and enhanced thermal stability of albumins@alumina: towards injectable sol-gel materials. *Chem. Commun.* 2013. № 49. P. 5636–5638.
- Van der Worp H. B., Gijn J. van. Acute ischemic stroke. *New Eng. J. Med.* 2007. № 357. P. 572–579.
- Vinogradov V., Avnir D. Exceptional thermal stability of therapeutical enzymes entrapped in alumina sol-gel matrices. *J. Mater. Chem. B.* 2014. № 2. P. 2868–2873.
- Vinogradov A. V., Ermakova A. V., Butman M. F., Hey-Hawkins E., Vinogradov V. V. A facile sol-gel synthesis of impurity-free nanocrystalline titania. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2014. № 16. 10614–10619.
- Wang M., Zhang J., Yuan Z., Yang W., Wu Q., Gu H. Targeted thrombolysis by using of magnetic mesoporous silica nanoparticles. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2012. № 8. P. 624–632.

**Vinogradov V. V.**, Petrozavodsk State University (Petrozavodsk, Russian Federation)  
**Dudanov I. P.**, Petrozavodsk State University (Petrozavodsk, Russian Federation)

## IMMOBILISATION OF PLASMINOGEN ACTIVATOR WITHIN POROUS ALUMINA MATRIX FOR CREATION OF NEW THROMBOLYTIC MATERIALS

A major obstacle in the development of new enzyme-based thrombolytic systems is their low stability and extremely short period of half-life (usually, less than 2–6 min of the circulation half-life), which requires their administration in large doses to obtain therapeutic effects, and, therefore, inevitably leads to a significant incidence of hemorrhagic complications. Here, we point out to a potential solution of this problem by developing a new family of injectable composites for thrombolysis: plasminogen activator entrapped within alumina. In that case alumina is a pertinent drug carrier developed to prolong activity *in vivo*, to reduce the total administered dose of the drug necessary for the treatment, and to decrease its side effects.

Key words: alumina, sol–gel synthesis, thrombolysis, plasminogen activator

### REFERENCES

1. Avnir D., Braun S., Lev O., Ottolenghi M. Enzymes and Other Proteins Entrapped in Sol-Gel Materials. *Chem. Mater.* 1994. № 6. P. 1605–1614.
2. Avnir D., Coradin T., Lev O., Livage J. Recent bio-applications of sol–gel materials. *J. Mater. Chem.* 2006. № 16. P. 1013–1030.
3. Bangert K., Johnsen A. H., Christensen U., Thorsen S. Different N-terminal forms of  $\alpha$ 2-plasmin inhibitor in human plasma. *Biochem.* 1993. № 291. P. 623–625.
4. Bennett W., Paonni N., Keyt B., Botstein D., Jones A. J. S., Presta L., Wurm F. M., Zoller M. J. High resolution analysis of functional determinants on human tissue-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 1991. № 266. P. 5191–5201.
5. Bi F., Zhang J., Su Y., Tang Y. C., and Liu J. N. Chemical conjugation of urokinase to magnetic nanoparticles for targeted thrombolysis. *Biomaterials.* 2009. № 30. P. 5125–5130.
6. Cesarmann-Maus G., Hajjar K. A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British Journal of Haematology.* 2005. № 129. P. 307–321.
7. Frenkel-Mullerad H., Avnir D. Sol-gel materials as efficient enzyme protectors: preserving the activity of phosphatases under extreme pH conditions. *J. Am. Chem. Soc.* 2005. № 127. P. 8077–8081.
8. Hacke W., Kaste M., Fieschi C., Kummer R. V., Davalos A., Meier D., Larreue V., Bluhmki E., Davis S., and Donnan G. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke. Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. *Lancet.* 1998. № 352. P. 1245–1251.
9. Lijnen H. R., Collen D. Strategies for the improvement of thrombolytic agents. *Thromb Haemostas.* 1991. № 66. P. 88–110.
10. Goldenberg N. A., Hathaway W. E., Jacobson L., Manco-Johnson M. J. A new global assay of coagulation and fibrinolysis. *Thrombosis Research.* 2005. № 116. P. 345–356.
11. Rutenberg A., Vinogradov V., Avnir D. Synthesis and enhanced thermal stability of albumins@alumina: towards injectable sol–gel materials. *Chem. Commun.* 2013. № 49. P. 5636–5638.
12. Van der Worp H. B., Gijn J. van. Acute ischemic stroke. *New Eng. J. Med.* 2007. № 357. P. 572–579.
13. Vinogradov V., Avnir D. Exceptional thermal stability of therapeutical enzymes entrapped in alumina sol–gel matrices. *J. Mater. Chem. B.* 2014. № 2. P. 2868–2873.
14. Vinogradov A. V., Ermakova A. V., Butman M. F., Hey-Hawkins E., Vinogradov V. V. A facile sol–gel synthesis of impurity-free nanocrystalline titania. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2014. № 16. 10614–10619.
15. Wang M., Zhang J., Yuan Z., Yang W., Wu Q., Gu H. Targeted thrombolysis by using of magnetic mesoporous silica nanoparticles. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2012. № 8. P. 624–632.

*Поступила в редакцию 11.03.2015*