

УДК 615.322 + 54-148 + 539.196.3

DOI: 10.15372/ChUR20160220

## Надмолекулярная структура арабиногалактана и его комплексов с диацетатом бетулина

М. А. МИХАЙЛЕНКО<sup>1</sup>, А. С. КОЗЛОВ<sup>2</sup>, М. Р. ШАРАФУТДИНОВ<sup>1,3</sup>, И. В. ЕЛЬЦОВ<sup>4</sup>, Т. П. ШАХТШНЕЙДЕР<sup>1,4</sup>,  
С. А. КУЗНЕЦОВА<sup>5,6</sup>, А. К. ПЕТРОВ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт химии твердого тела и механохимии Сибирского отделения РАН,  
ул. Кутателадзе, 18, Новосибирск 630128 (Россия)

E-mail: mikhailenko@solid.nsc.ru

<sup>2</sup>Институт химической кинетики и горения Сибирского отделения РАН,  
ул. Институтская, 3, Новосибирск 630090 (Россия)

<sup>3</sup>Институт ядерной физики Сибирского отделения РАН,  
проспект Академика Лаврентьева, 11, Новосибирск 630090 (Россия)

<sup>4</sup>Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,  
ул. Пирогова, 2, Новосибирск 630090 (Россия)

<sup>5</sup>Институт химии и химической технологии Сибирского отделения РАН,  
Академгородок, 50, стр. 24, Красноярск 660036 (Россия)

<sup>6</sup>Сибирский федеральный университет,  
проспект Свободный, 79, Красноярск 660041 (Россия)

### АННОТАЦИЯ

Изучена надмолекулярная структура арабиногалактана и его комплексов с диацетатом бетулина. С использованием методов малоуглового рентгеновского рассеяния и лазерной абляции показано наличие в растворах ассоциатов арабиногалактана, образование которых может происходить за счет взаимодействия как с молекулами воды, так и с молекулами диацетата бетулина.

**Ключевые слова:** арабиногалактан, комплекс арабиногалактана с диацетатом бетулина, надмолекулярная структура

### ВВЕДЕНИЕ

Арабиногалактан (АГ) – водорастворимый природный полисахарид, обладающий рядом уникальных свойств [1]. Получение межмолекулярных комплексов плохо растворимых в воде лекарственных веществ с АГ, выделенным из лиственницы *Larix sibirica*, позволяет улучшить их фармакологические свойства [2, 3]. Структура макромолекул АГ из древесины *Larix sibirica* похожа на структуру молекул АГ, выделенного из других видов *Larix*

[4]. Полимер имеет разветвленную молекулярную структуру, его основная цепь состоит из (1→3)-связанных *D*-галактопиранозных единиц [→3)-β-*D*-Galp-(1→] с ветвлениями при атоме С6 у большинства остатков. Боковые цепи содержат 3,6-ди-*O*-замещенные и 6-*O*-замещенные остатки галактопиранозила, 3-*O*-замещенные остатки арабинофуранозила, а также арабинофуранозил, арабино- и галактопиранозил, невозстанавливающие терминальные единицы. Возможность использования АГ в качестве стабилизатора, напол-

нителя и носителя для лекарственных веществ в значительной степени зависит от молекулярной массы полимера [5].

Ранее [6] мы сообщали о получении композитов АГ с диацетатом бетулина (ДАБ) в шаровой мельнице. Показано, что механокомпозиты АГ с ДАБ способны индуцировать процессы элиминации клеток асцитной карциномы Эрлиха. Комплексы АГ с ДАБ были получены также из водных растворов механически активированных или исходных смесей в виде аморфных пленок. Пленки легко растворимы в воде и обладают более высокой активностью против культур клеток аденокарциномы легких А549 по сравнению с ДАБ, его физическими и механоактивированными смесями с АГ [7]. Сам АГ не обладает подобной активностью, а усиление противоопухолевых свойств, скорее всего, обусловлено образованием комплекса с ДАБ [8].

Различия в активности АГ, его композитов и комплексов с ДАБ могут быть связаны с особенностями надмолекулярной структуры. Исследование структуры АГ и его комплексов с ДАБ как в твердом состоянии, так и в растворах позволит понять различия в фармакологической активности композитов и в дальнейшем оптимизировать способ их получения.

Один из способов исследования надмолекулярной структуры – метод абляции растворов с использованием субмиллиметрового излучения, энергетическое воздействие которого приводит к возбуждению колебаний молекул и их комплексов в целом и не приводит к деструкции химических связей. Одним из мощных источников терагерцового излучения является Новосибирский лазер на свободных электронах Института ядерной физики СО РАН (ИЯФ СО РАН) [9], спектр излучения которого позволяет исследовать биологические объекты без их денатурирования [10]. Другой способ, нашедший широкое применение, – метод малоуглового рассеяния рентгеновского излучения.

Цель данной работы – изучение супрамолекулярной архитектуры АГ и его комплекса с ДАБ в растворах. Для выяснения влияния свойств растворителя на надмолекулярную структуру АГ и его комплекса эксперименты проводились как в водных растворах, так и с использованием апротонного растворителя – диметилсульфоксида (ДМСО).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Арабиногалактан ( $M_r = 17000$ ) выделяли из лиственницы (*Larix sibirica* Ledeb.) в Институте химии и химической технологии СО РАН (ИХХТ СО РАН) по оригинальному способу [11]. Диацетат бетулина получали в ИХХТ СО РАН непосредственно из бересты *Betula pendula*, без отдельного этапа выделения бетулина [12]. После дополнительной очистки содержание примесей, определенное хроматографически, составляло менее 1.4 %.

Диметилсульфоксид квалификации “х. ч.” (ООО “Союзхимпром”, Россия) сушили с помощью прокаленного  $Na_2SO_4$ .

Комплекс АГ с ДАБ получали следующим образом: смесь АГ (180 мг) и ДАБ (20 мг) помещали в сосуд с 250 мл воды и перемешивали при 37 °С в течение 48 ч. Раствор фильтровали через фильтр с размером пор 0.22 мкм для удаления избытка ДАБ. Фильтраты испаряли при 35–40 °С и пониженном давлении (роторный испаритель ИК-1М, Россия). После выпаривания получали комплекс АГ с ДАБ в виде тонких гибких пленок. Содержание ДАБ в пленках, определенное методом ВЭЖХ после экстракции хлороформом, составляло 2–2.5 мас. %.

Сравнительное исследование АГ и его комплекса с ДАБ методом ЯМР ( $^1H$  и  $^{13}C$ ) проводили с использованием спектрометра Bruker Avance III 500 (рабочие частоты 500.13 (1H) и 125.76 МГц ( $^{13}C$ )). Поскольку абсолютные данные о химических сдвигах не требовались, в качестве образца сравнения использовали смесь ацетон/ $D_2O$ .

Исследование методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) проводили на станции “Дифракционное кино” (ЦКП СЦСТИ), длина волны 1.516 Å. Использовали однокоординатный детектор ОД-3М, разработанный в ИЯФ СО РАН [13]. Образцы снимали на просвет. Кювета, куда помещался раствор, выполнена из двух пластинок слюды, не дающих сигнал МУРР, и резиновой прокладки. Толщину прокладки выбирали такой, чтобы проходил прямой пучок. Исследовали растворы с концентрацией 1, 5 и 25 % АГ в воде. При обработке данных вычитали сигнал растворителя. Обработку проводили в допущении сферической формы частиц, ис-

пользуя алгоритмы обработки данных МУРР [14, 15].

Исследование размеров частиц методом абляции растворов субмиллиметровым излучением проводили с помощью установки ЦКП СЦСТИ – лазер на свободных электронах (ЛСЭ), разработанной и созданной в ИЯФ СО РАН. Диапазон длин волн излучения в 120–240 мкм соответствует 2.5–1.25 ТГц. В экспериментах использовали длину волны излучения  $(130 \pm 2)$  мкм при средней мощности излучения 15 Вт. Для измерения размеров аэрозольных наночастиц использовали разработанный в Институте химической кинетики и горения СО РАН диффузионный спектрометр аэрозолей (ДСА) [16] и электростатический классификатор частиц SMPS+C (Grimm Aerosol Technik GmbH & Co.KG, Германия). Определяемый приборным комплексом диапазон размеров аэрозольных частиц составлял 0.003–1.1 мкм. Распределение частиц по размерам получали суммированием результатов 4–5 измерений и последующей нормировки на максимум.

Для сравнения оценку размеров частиц проводили методом атомно-силовой микроскопии. Для АСМ-исследования использовали сканирующую зондовую нанолaborаторию “Интегра” (ЗАО НТ-МДТ, Зеленоград, Россия). Измерения проводили в полуконтактном режиме с использованием кантилверов марки NSG01\_DLC. Для приготовления препаратов использовали слюду марки “С0 Н” 30Ч40 ГОСТ 7134–82 (Балашовский слюдяной комбинат, Россия). Пластины слюды расслаивали с помощью бритвенного лезвия и брали свежесколотую поверхность. Из газовой фазы наночастицы отбирали с помощью термопреципитатора [17]. Наночастицы осаждали непосредственно на свежесколотую поверхность слюды, размещая пластину слюды размером  $3 \times 3$  мм внутри пробоотборника.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обработка данных, полученных методом МУРР, показала, что в растворе АГ максимум функции распределения расстояний  $P(R)$  приходится на размер частиц 3.5–4.5 нм (рис. 1, кривая 1). Это соответствует размеру

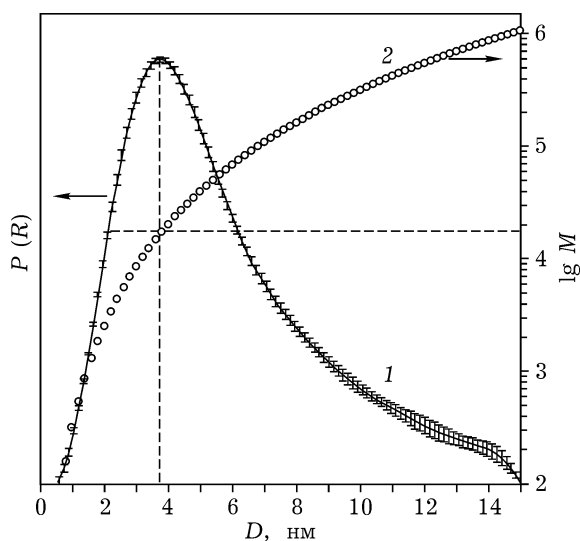


Рис. 1. Экспериментальные данные МУРР для 5% раствора АГ в воде (1) и расчетные данные по молекулярной массе (2).

молекулы АГ массой 14–45 кДа (если принять, что плотность варьирует в пределах 1–1.5, а молекула АГ имеет сферическую форму). Кроме того, велико количество частиц с большими размерами. На рис. 1 приведены результаты обработки данных МУРР для 5% раствора АГ в воде в сопоставлении с расчетными размерами молекул АГ при плотности, равной 1 (кривая 2).

Предварительные исследования показали, что оптимальная концентрация АГ для исследований составляет менее 10 мг/мл. При дальнейшем повышении концентрации в водных растворах наблюдается ступенчатый характер распределения частиц по размерам, связанный с агрегацией частиц АГ.

При абляции водных растворов АГ в аэрозоле размеры частиц уменьшаются. На рис. 2 показано изменение во времени положения максимума распределения частиц в аэрозоле и АСМ-изображение пластины из слюды, на которую осаждались частицы АГ при абляции 1% водного раствора.

Осажденные из газовой фазы частицы имеют сферическую форму и размер 10–100 нм, что несколько меньше наблюдаемого при абляции. Подобный эффект наблюдался при исследовании методом абляции ДНК [18]. В нашем случае это может быть связано с потерей воды при осаждении.

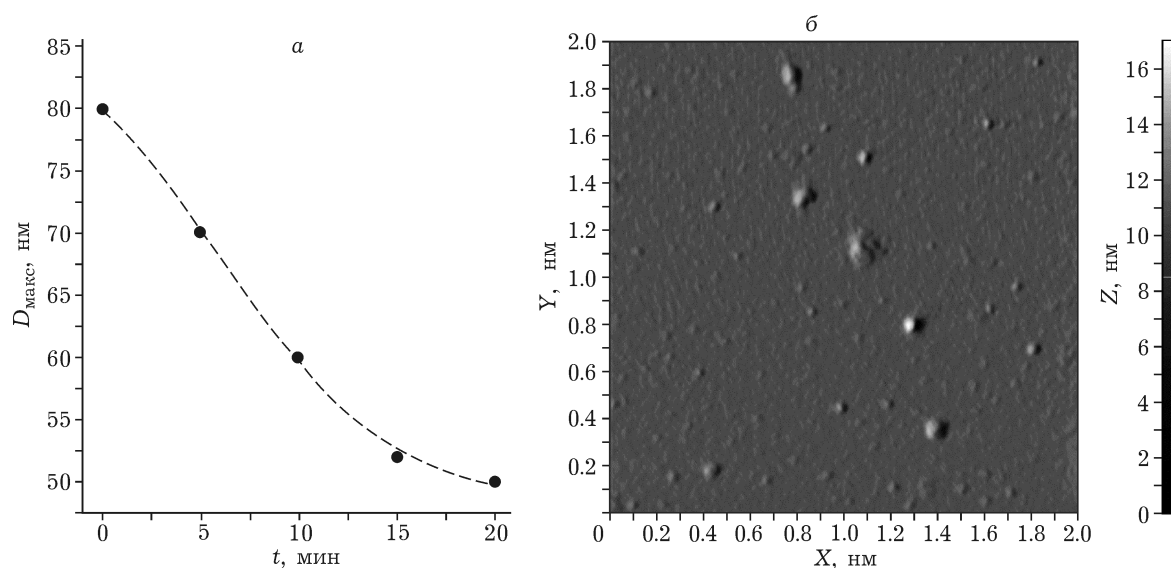


Рис. 2. Временная зависимость положения максимума распределения частиц АГ в газовой фазе (а) и АСМ-изображение частиц АГ, осажденных из газовой фазы на подложку (рельеф; размер скана  $2 \times 2$  мкм) (б).

Размер частиц зависит от растворителя. В апротонном ДМСО распределение частиц имеет максимум при 3–5 нм, что близко к значению, полученному методом МУРР. В смесях ДМСО – вода наблюдается сдвиг максимума распределения размеров частиц АГ до 17–22 и 35–50 нм при содержании воды в смесях с ДМСО 1 и 10 об. % соответственно. Максимум распределения частиц в водном растворе АГ соответствует области 60–70 нм.

Ранее на основе сравнительного исследования молекулярной массы АГ и его комплекса с ДАБ мы предположили, что при образовании комплекса ДАБ может взаимодействовать с несколькими молекулами АГ [6]. Действительно, результаты исследования АГ и смесей ДАБ–АГ в растворах ДМСО показывают, что доля частиц более 10 нм возрастает в присутствии ДАБ. Заметим, что при исследовании растворов ДАБ в ДМСО частиц с размерами 5–300 нм не зафиксировано.

$^{13}\text{C}$  ЯМР-исследование АГ и его комплекса с ДАБ показало, что при образовании комплекса изменениям подвергаются сигналы АГ в области 104–106 м. д., которые связаны с фрагментами  $\rightarrow 3,6\text{-Galp-(1}\rightarrow + \rightarrow 6\text{-Galp-(1}\rightarrow$  боковых цепей АГ, содержащих два и более углеводных остатка [19].

На рис. 3 представлены результаты исследования растворов комплекса ДАБ–АГ в воде и ДМСО. Для сравнения приведены данные по

распределению частиц в водных растворах АГ. Видно, что в случае образования комплекса ДАБ с АГ размеры частиц в воде увеличиваются с одновременным уменьшением ширины распределения по сравнению с АГ. В ДМСО кривая распределения по размерам комплекса ДАБ–АГ показывает наличие второго максимума распределения с размерами частиц более 10 нм, чего не наблюдается для раствора АГ в ДМСО (не приведена). Увеличение размеров ассоциатов в воде и повы-

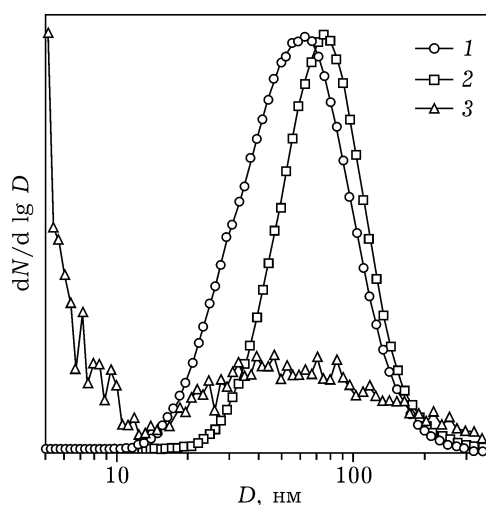


Рис. 3. Кривые распределения частиц по размерам при абляции 1 % растворов: 1 – АГ в воде, 2, 3 – комплекс ДАБ–АГ в воде (2) и в ДМСО (3).

шение доли крупных частиц в ДМСО может быть связано как с участием ДАБ в образовании связей между молекулами АГ, так и с повышением устойчивости ассоциатов ДАБ–АГ в ДМСО–растворе.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что АГ и его комплекс с ДАБ могут образовывать в растворах ассоциаты размерами до 200 нм. Использование двух растворителей: протонного (воды) и апротонного (ДМСО) – показало, что размер конгломератов зависит от свойств растворителя. Это позволяет предположить, что в водном растворе АГ ассоциаты формируются за счет водородных связей между молекулами АГ и воды. Аналогично, в апротонном растворителе ДАБ может участвовать в укрупнении частиц АГ, образуя связи с молекулами полимера. Обнаруженная в растворах надмолекулярная структура может сохраняться в аморфных пленках, получающихся при испарении растворителя.

Работа выполнена с использованием оборудования Сибирского центра синхротронного и терагерцового излучения при финансовой поддержке РФФИ (научный проект № 14-03-31900-мол-а).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Paulsen B. S., Barsett H. // *Polysaccharides 1: Structure, Characterization and Use* / Ed. T. Heinze. Berlin: Springer-Verlag, 2005. P. 69–101.
- Метелева Е. С., Душкин А. В., Толстикова Т. Г., Толстиков Г. А., Поляков Н. Э., Медведева Е. Н., Неверова Н. А., Бабкин В. А. // *Изв. РАН, Сер. хим.* 2008. № 6. С. 1274–1282.
- Dushkin A. V., Tolstikova T. G., Khvostov M. V., Tolstikov G. A. // *The Complex World of Polysaccharides* / Desiree Nedra Karunaratne (Ed.). Rijeka: InTech, 2012. P. 573–602.
- Антонова Г. Ф., Усов А. И. // *Биоорганическая химия*. 1984. Т. 10. С. 1664–1669.
- Медведева Е. Н., Бабкин В. А., Остроухова Л. А. // *Химия раст. сырья*. 2003. Т. 1. С. 27–37.
- Shakhtshneider T. P., Kuznetsova S. A., Mikhailenko M. A., Zamai A. S., Malyar Yu. N., Zamai T. N., Boldyrev V. V. // *Chem. Nat. Compd.* 2013. Vol. 49. P. 470–474.
- Кузнецова С. А., Шахтшнейдер Т. П., Михайленко М. А., Мальяр Ю. Н., Спивак Е. А., Замай Т. Н., Замай А. С., Чесноков С. В., Кузнецов Б. Н., Болдырев В. В. // *Докл. АН.* 2014. Т. 459. С. 182–184.
- Shakhtshneider T. P., Kuznetsova S. A., Zamay A. S., Zamay T. N., Spivak E. A., Mikhailenko M. A., Malyar Yu. N., Kuznetsov B. N., Chesnokov V. N., Boldyrev V. V. // *Natural Product Research*. 2015, DOI: 10.1080/14786419.2015.1060591.
- Antokhin E. A., Akberdin R. R., Arbuzov V. S., Bokov M. A., Bolotin V. P., Burenkov D. B., Bushuev A. A., Veremeenko V. F., Vinokurov N. A., Vobly P. D., Gavrilov N. G., Gorniker E. I., Gorchakov K. M., Grigoryev V. N., Gudkov B. A., Davydov A. V., Deichuli O. I., Dementyev E. N., Dovzhenko B. A., Dubrovina A. N., Evtushenko Yu. A., Zagorodnikov E. I., Zaigraeva N. S., Zakutov E. M., Erokhin A. I., Kayran D. A., Kiselev O. B., Knyazev B. A., Kozak V. R., Kolmogorov V. V., Kolobanov E. I., Kondakov A. A., Kondakova N. L., Krutikhin S. A., Kryuchkov A. M., Kubarev V. V., Kulipanov G. N., Kuper E. A., Kuptsov I. V., Kurkin G. Ya., Labutskaya E. A., Leontyevskaya L. G., Loskutov V. Yu., Matveenko A. N., Medvedev L. E., Medvedko A. S., Miginsky S. V., Mironenko L. A., Motygin S. V., Oreshkov A. D., Ovchar V. K., Osipov V. N., Persov B. Z., Petrov S. P., Petrov V. M., Pilan A. M., Poletaev I. V., Polyanskiy A. V., Popik V. M., Popov A. M., Rotov E. A., Salikova T. V., Sedliarov I. K., Selivanov P. A., Serebnyakov S. S., Skrinisky A. N., Tararyshkin S. V., Timoshina L. A., Tribendis A. G., Kholopov M. A., Cherepanov V. P., Shevchenko O. A., Shteinke A. R., Shubin E. I., Scheglov M. A. // *Nucl. Instr. & Methods in Phys. Res.*, A. 2004. Vol. 528. P. 15–18.
- Petrov A. K., Kozlov A. S., Malyshkin S. B., Taraban M. B., Popik V. M., Scheglov M. A., Goriachkovskaya T. N., Peltek S. E. // *Nucl. Instr. & Methods in Phys. Res.*, A. 2007. Vol. 575. P. 68–71.
- Пат. 2273646. С 08 В 37/00 РФ, 2006.
- Кузнецова С. А., Кузнецов Б. Н., Скворцова Г. П., Васильева Н. Ю., Скурыдина Е. С., Калачева Г. С. // *Химия уст. развития*. 2010. Т. 18, № 3. С. 313–320.
- Aulchenko V. M., Evdokov O. V., Kutovenko V. D., Pirogov B. Ya., Sharafutdinov M. R., Titov V. M., Tolochko B. P., Vasiljev A. V., Zhogin I. A., Zhulanov V. V. // *Nucl. Instr. Methods Phys. Res.*, A. 2009. Vol. 603. P. 76–79.
- Свергун Д. И., Фейгин Л. А. *Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние*. М.: Наука, 1986. 280 с.
- Svergun D. I. // *J. Appl. Cryst.* 1992. Vol. 25. P. 495–503.
- Анкилов А. Н., Бакланов А. М., Власенко А. Л., Козлов А. С., Малышкин С. Б. // *Оптика атмосферы и океана*. 2000. Т. 13. С. 644–648.
- Gonzalez D., Nasibulin A. G., Brown D. P., Queipo P., Kauppinen E. I., Baklanov A. M., Shandakov S. D. // *Aerosol Sci. Technol.* 2005. Vol. 39. P. 1064–1071.
- Горячковская Т. Н., Козлов А. С., Попик В. М., Колчанов Н. А., Пельтек С. Е. // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014. Т. 18. С. 1013–1020.
- Willfor S., Sjolholm R., Laine C., Holmbom B. // *Wood Sci. Technol.* 2002. Vol. 36. P. 101–110.

