

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего образования  
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ


КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

Направление: 03.04.02 Физика  
Профиль: Медицинская физика

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ  
ВЫЯВЛЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ АГРЕГАЦИИ ПЕКТИНОВЫХ  
ПОЛИСАХАРИДОВ РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУРНЫХ ТИПОВ И  
РАЗРАБОТКА НА ИХ ОСНОВЕ СИСТЕМ ДОСТАВКИ  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Студент 2 курса группы 06-119


«15» июня 2023 г.

  
(Коробкина О.С.)

Научный руководитель

к.б.н., доцент

«15» июня 2023 г.

  
(Горшков В.Ю.)

Научный консультант

к.б.н., в.н.с. КИББ ФИЦ КазНЦ РАН

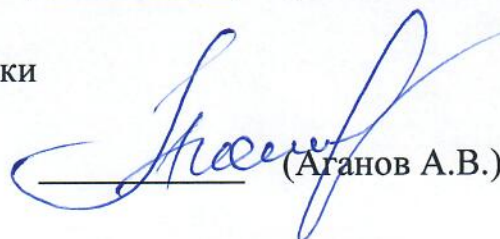
«15» июня 2023 г.

  
(Микшина П.В.)

Заведующий кафедрой медицинской физики

д.х.н., профессор

«15» июня 2023 г.

  
(Аганов А.В.)

Казань-2023

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>ГЛАВА 1. НАДМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СТРУКТУРЫ ПОЛИСАХАРИДОВ В РАСТЕНИЯХ И ТЕХНОЛОГИЯХ</b> .....	9
1.1. ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ПОЛИСАХАРИДАМИ НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР .....	9
1.1.1. Уровни структурной организации полисахаридов .....	9
1.1.2. Самоорганизация различных типов растительных полисахаридов .....	12
1.1.3. Углевод-углеводные взаимодействия полисахаридов <i>in vivo</i> и клеточная стенка как надмолекулярный полисахаридный ансамбль .....	18
1.1.4. Использование пектинов в системах доставки лекарств ....	22
1.2. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ОРГАНИЗАЦИИ И СВОЙСТВ ПОЛИСАХАРИДОВ И КОМПЛЕКСОВ .....	27
1.2.1. Динамическое рассеяние света .....	27
1.2.2. Статическое рассеяние света .....	29
1.2.3. Атомно-силовая микроскопия .....	33
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	37
2.1. ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	37
2.2. ПОЛУЧЕНИЕ, ОЧИСТКА И БИОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПЕКТИНОВЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ НА БАЗЕ РАМНОГАЛАКТУРОНАНОВОГО ОСТОВА .....	37
2.3. ПОЛУЧЕНИЕ ПОРОШКА УДХК .....	40
2.4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ТАБЛЕТОК ИЗ ПГК С ЗАГРУЖЕННОЙ УДХК .....	40
2.5. ЭКСПЕРИМЕНТЫ ПО РН-ЗАВИСИМОМУ ВЫСВОБОЖДЕНИЮ УДХК ИЗ ПЕКТИНОВЫХ ТАБЛЕТОК .....	41
2.6. АНАЛИЗ ВЫХОДА УДХК МЕТОДОМ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ .....	41

2.7. ЭКСПЕРИМЕНТЫ ПО ДИНАМИЧЕСКОМУ И СТАТИЧЕСКОМУ РАССЕЙЯНИЮ СВЕТА ПЕКТИНАМИ РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУРНЫХ ТИПОВ .....	42
2.8. АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ПЕКТИНОВ РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУРНЫХ ТИПОВ .....	45
2.9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ УГЛЕВОДОВ В ОБРАЗЦАХ.....	47
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....</b>	<b>48</b>
3.1. ОЦЕНКА ВЫХОДА УДХК ИЗ ТАБЛЕТОК С ПГК ТРЕХ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ .....	48
3.1.1. Выход УДХК из высокометоксилированной ПГК.....	50
3.1.2. Выход УДХК из низкометоксилированной ПГК .....	51
3.1.3. Выход УДХК из низкометоксилированной амидированной ПГК.....	53
3.2. ВЫЯВЛЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ФАКТОРОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ РАЗЛИЧИЯ В МЕХАНИЗМАХ АГРЕГАЦИИ ПЕКТИНОВ РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУРНЫХ ТИПОВ .....	54
3.2.1. Особенности агрегации полигалактурановой кислоты.....	55
3.2.2. Особенности агрегации картофельного рамногалактуранана I .....	58
3.2.3. Особенности агрегации льняного рамногалактуранана I ....	62
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>67</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>68</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>69</b>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ПГК – полигалактуроновая кислота  
РГ-I – рамногалактуронан I  
РГ-II – рамногалактуронан II  
УДХК – урсодезоксихолеваая кислота  
лРГ-I – льняной рамногалактуронан I  
кРГ-I – картофельный рамногалактуронан I  
ВМ – высокометоксилированный  
НМ – низкометоксилированный  
Rha – рамноза  
Ara – арабиноза  
Gal – галактоза  
Glc – глюкоза  
GalA – галактановая кислота  
Fuc – фукоза  
Xyl – ксилоза  
OMe – метоксильная группа  
OAc – ацетоксильная группа  
AceA – ацетовая кислота  
Api – апиоза  
Dha – 3-дезоксид-Д-лихсо-гептулозаровая кислота  
Kdo – 2-кетод-3-дезоксид-Д-манно-октоновая кислота  
РНКаза – рибонуклеаза  
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография  
DMA – N,N-диметилацетамид  
ДРС – динамическое рассеяние света  
СРС – статическое рассеяние света  
АСМ – атомно-силовая микроскопия  
PTFE – политетрафторэтилен

## ВВЕДЕНИЕ

Пектиновые полисахариды – это класс растительных биополимеров, широко варьирующих как структурно, так и функционально. Основным признаком всех пектинов является наличие в их структуре галактуроновой кислоты, которая придает молекуле отрицательный заряд. Специфику строения пектиновым полисахаридам, влияющую на их свойства, функции и применение, могут придавать как состав остова (у полигалактуроновой кислоты, ПГК, он состоит только из остатков галактуроновой кислоты, карбоксильная группа которой может быть модифицирована, у рамногалактуронана I, РГ-I, остатки галактуроновой кислоты чередуются с остатками рамнозы), так и состав и длина боковых цепей РГ-I, а также определенные соотношения различных видов пектинов в макромолекуле. Физико-химические и биологические свойства разных типов пектинов зависят от их структуры, а разнообразие структуры даже в рамках одного типа полисахарида говорит о большой ширине спектра возможного применения этих природных полимеров.

Способность пектинов формировать гелевые матрицы и агрегаты, пригодные для загрузки других молекул, возможность управлять процессами гелеобразования и агрегацией молекул путем изменения условий среды и/или варьирования элементами строения и сочетанием набора пектиновых молекул и, самое главное, безопасность употребления этих полисахаридов человеком – все это наталкивает на идею использовать пектиновые матрицы для доставки лекарств в кишечник. Эта концепция не нова: достаточно активно идет изучение подобных пектиновых систем, часто в комбинации с другими органическими молекулами. При этом в основном используется классический, хорошо изученный пектин – ПГК, а полный потенциал этого класса полисахаридов, заключающийся в разнообразии их структур и свойств, остается нереализованным.

Лекарственные формы гепатопротектора урсодезоксихолиевой кислоты (УДХК), представленные на рынке, часто содержат вспомогательные вещества, которые могут негативно сказываться на состоянии печени и других органов (например, диоксид титана). Поэтому создание безопасной биосовместимой лекарственной формы является актуальной задачей, а пектин – хорошим претендентом на ее решение. Помимо этого, пектины, как и ряд других растительных полисахаридов, – вещество, обладающее пребиотическими свойствами, обеспечивающими поддержание микрофлоры толстого кишечника. Соответственно, разработка матрицы для доставки УДХК на его основе позволяет не только обезопасить процесс введения гепатопротектора в организм, но и получить биодружественный комбинированный препарат двойного действия.

*Цель работы и задачи.*

Целью данной работы является разработка новых матриц на основе ПГК для доставки гепатопротектора урсодезоксихолиевой кислоты к месту абсорбции – тонкому кишечнику, а также выявление специфики формирования надмолекулярных структур более широким структурно-функциональным спектром пектинов в привязке к особенностям строения их молекул.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Нарботка высокоочищенных структурно-разнообразных типов пектиновых полисахаридов.
2. Характеристика особенностей строения используемых в работе пектинов: ПГК трех типов, картофельного РГ и льняного РГ.
3. Получение таблетированных форм из различных типов ПГК с загруженной в них урсодезоксихолиевой кислотой.
4. Оценка динамики высвобождения УДХК из таблеток на основе различных типов ПГК в имитированных средах желудочно-кишечного тракта (рН-зависимое высвобождение).

5. Выявление структурных факторов, определяющих различия в механизмах агрегации ПГК и двух различных типов РГ.

Ключевыми методами, используемыми в работе для реализации задач, служили динамическое и статическое рассеяние света, атомно-силовая микроскопия и различные виды хроматографии.

*Новизна.*

Особенности взаимодействия пектиновых полисахаридов друг с другом в пределах одного структурного типа исследуются уже не одно десятилетие. Наибольшие успехи в этом направлении были достигнуты для полигалактуроновой кислоты – классического гелеобразователя [1, 2, 3, 4], активно используемого в различных пищевых и медицинских технологиях. Единичные сведения о механизмах формирования надмолекулярных структур представлены и для рамногалактуронана I [5, 6, 7, 8, 9]. При этом большинство этих работ не ставит своей целью выявить особенности формирования надмолекулярных структур полисахаридов в привязке к специфике строения и не включают экспериментов сопоставительного плана на различных структурных типах пектиновых веществ, что может иметь значение при последующей разработке функциональных приложений для этих веществ. В этой работе планируется сделать шаги на пути к ликвидации этого пробела.

Одним из значимых приложений использования полисахаридов в медицинских целях служит разработка на их основе биопрепаратов и систем доставки лекарственных средств. Важную группу таких средств составляют препараты, нацеленные на поддержание нормального функционального состояния печени. Однако, на рынке, как и в литературе, на данный момент не представлено готовых решений, направленных на эффективную и безопасную доставку гепатопротекторов (УДХК) к месту абсорбции. При этом потребность в таких решениях, несмотря на существование широкой линейки гепатопротекторов в продаже в целом, до сих пор сохраняется, а разработки в этой области активно продолжают проводиться. Предлагаемый

в этой работе ориентир на использование в качестве систем доставки пектиновых полисахаридов может открыть новые пути в решении проблем доставки гепатопротекторов, как за счет биобезопасности пектиновых матриц и возможности снижения балластной нагрузки лекарственных форм, так и благодаря возможности тонкого регулирования высвобождения препарата за счет специфики строения различных структурных типов пектинов.

*Научно-практическая значимость.*

Разработка матриц на основе пектиновых полисахаридов поможет значительно увеличить эффективность доставки УДХК в тонкий кишечник и не только обезопасит лекарственную форму, позволяя избавиться от небезопасных вспомогательных веществ, но и обеспечит дополнительный источник пребиотиков для людей, принимающих УДХК.

Полученные в данной работе сведения об особенностях агрегации пектинов в зависимости от молекулярной структуры может послужить основой для разработки предложений по эффективному использованию различных типов пектиновых полисахаридов в медицине и пищевых технологиях, а также базисом для понимания их роли в формировании архитектуры и свойств содержащих эти биополимеры клеточных стенок, а значит и для установления механизмов роста, развития и специализации растительных клеток.



# ГЛАВА 1. НАДМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СТРУКТУРЫ ПОЛИСАХАРИДОВ В РАСТЕНИЯХ И ТЕХНОЛОГИЯХ

## 1.1. Особенности формирования полисахаридами надмолекулярных структур

### 1.1.1. Уровни структурной организации полисахаридов

Аналогично белкам, конформация полисахаридов может быть определена на нескольких различных уровнях организации, которые стабилизируются с помощью различных типов молекулярных взаимодействий. Первичная структура полисахарида определяется типом и последовательностью моносахаридов, типами связей, поперечными сшивками внутри цепей или между ними. Ковалентные связи между соседними моносахаридными единицами ограничивают их свободу движения, тем самым навязывая предпочтительную молекулярную конформацию, или вторичную структуру, например, ленты (ксилан, целлюлоза) или случайные спирали (гиалуроновая кислота). Вторичная структура может быть стабилизирована внутримолекулярными водородными связями, электростатическими взаимодействиями и т. д. Затем межмолекулярные ассоциации вторичных структур за счет, например, межмолекулярных водородных связей или межмолекулярных переплетений цепей приводят к третичной структуре: двойным спиральям (ксантановая камедь), тройным спиральям (шизофиллан), кристаллоподобным структурам (целлюлоза) и запутанным статистическим клубкам (арабинаны). [10, 11, 12]

Дальнейшая организация упорядоченных третичных структур может привести к структурам более высокого уровня, как это происходит, например, когда полисахариды образуют гели.

В смысле первичной структуры полисахариды могут различаться собственно моносахаридным составом, абсолютной конфигурацией

отдельных моносахаридов, порядком их соединения, конфигурацией ( $\alpha$ - или  $\beta$ -) отдельных гликозидных связей, степенью полимеризации, точками ветвления, а также типом замещения, характером и расположением модифицирующих групп.

Первичная структура полисахаридной молекулы оказывает непосредственное влияние на ее вторичную структуру. Основные варианты вторичной структуры представлены, как правило, спиралями, которые для линейных гомополисахаридов можно разделить на четыре типа в зависимости от количества мономеров, приходящихся на виток,  $n$ , и шага спирали  $h$  (длины проекции мономера на ось спирали) [13].

Тип А – плоские лентообразные структуры с  $n = 2 \pm 4$  и значением  $h$ , близким к абсолютной длине остатка. При такой конформации экваториальные связи O-C-4 и C-1-O параллельны друг другу и находятся почти на одной прямой относительно плоскости кольца. К этому типу относятся такие полисахариды, как целлюлоза, остов ксилоглюкана,  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-ксилан и  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-маннан.

Тип В – U-повернутая полая спираль с широким диапазоном значений  $n = 2 \pm 10$  и приближающимся к нулю значением  $h$ . Такая конформация формируется, если одна из гликозидных связей пиранозного кольца является аксиальной, а другая – экваториальной. Структуры типа В формирует  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-галактан и  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-глюкан (каллоза).

Тип С – изогнутая (гофрированная) лента. К этому типу относятся структуры, сформированные аксиальными связями, которые почти параллельны друг другу, но смещены относительно пиранозного кольца, не ложась на одну прямую; за счет этого на уровне каждого моносахаридного остатка в полисахаридной цепи возникает изгиб. Такую структуру имеет, например,  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-галактуронан.

Тип D – статистический клубок. К типу D относятся гомополимеры, в которых связь образована экзоциклическим гидроксилом, например,  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 5)-L-арабинан.

Третичная структура полисахаридов определяется ближними взаимодействиями вдоль молекулярной цепи, дальними объемными взаимодействиями, энтропийными эффектами, взаимодействиями с внешней средой и стабилизируется водородными и ионными связями. В отличие от белков, для полисахаридов не известны случаи упаковки в определенный объем [14, 15]. Упорядоченные формы гомополисахаридов с регулярным строением исключают резкие изгибы цепей, препятствуя фолдингу молекулы. В сложных разветвленных полисахаридах возможно сближение и взаимодействие отдаленных друг от друга остатков моносахаридов. Однако, как правило, для макромолекул разветвленных полисахаридов характерно отсутствие кристаллической структуры.

Четвертичная структура формируется в результате ассоциации индивидуальных молекул; выраженная четвертичная структура характерна для многих полисахаридов растительной клеточной стенки. Лентообразные структуры типа А наиболее легко накладываются друг на друга и создают надмолекулярные образования за счет многочисленных водородных связей и сил Ван-дер-Ваальса. В результате формируются структуры, регулярные в трех измерениях, что характерно для кристаллов. Для ряда полисахаридных цепей продемонстрирована способность к образованию двойных, тройных спиралей и агрегатов спиралей и лент [16, 17, 18]. Одна цепь может проходить через несколько участков ассоциаций, в результате чего устанавливаются трехмерные сети, или гели. Многие структуры, в первую очередь, микрофибриллы целлюлозы и гели полигалактуроновой кислоты, детально охарактеризованы и с химической, и с биологической точки зрения. Есть отдельные работы, касающиеся надмолекулярных образований ксилана [19], глюкоманнана [20], галактана [21, 22], каллозы [23], рамногалактуронана I [5].

## 1.1.2. Самоорганизация различных типов растительных полисахаридов

Целлюлоза – это линейный гомополимер, состоящий из остатков глюкозы, соединенных  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-гликозидными связями. На каждом конце целлюлозной цепи находятся две разные группы: с одного конца – невосстанавливающая группа, где обнаруживается замкнутая кольцевая структура; с другого – восстанавливающая группа как с алифатической структурой, так и с карбонильной группой. Цепь целлюлозы, таким образом, представляет собой поляризованную молекулу, и новые остатки глюкозы присоединены к невосстанавливающему концу, что позволяет удлинить цепь. [24] Степень полимеризации нативной целлюлозы различного происхождения находится в диапазоне 1000-30000 остатков, что соответствует длине цепи от 500 до 15000 нм. Целлюлоза, полученная после выделения, имеет степень полимеризации от 800 до 3000 [25].

Три гидроксильные группы и атомы кислорода кольца и гликозидной связи могут взаимодействовать друг с другом внутри отдельной молекулы целлюлозы или с соседней целлюлозной цепью, в результате чего образуются внутримолекулярные и межмолекулярные водородные связи. Сильные системы водородных связей определяют такие свойства целлюлозы, как ограниченная растворимость в большинстве растворителей, низкая реакционная способность гидроксильных групп и кристалличность [26]. Ввиду того, что целлюлоза также содержит гидрофобные области (вокруг атомов углерода), продолжается дискуссия о влиянии гидрофобных взаимодействий на общие свойства, включая нерастворимость [27]. Разнообразные возможности образования водородных связей приводят к различным трехмерным структурам. По характерным рентгенограммам и спектрам ядерного магнитного резонанса  $^{13}\text{C}$  идентифицированы четыре различных кристаллических алломорфа целлюлозы: целлюлозы I, II, III (III<sub>I</sub>, III<sub>II</sub>) и IV (IV<sub>I</sub>, IV<sub>II</sub>). Наиболее важными алломорфами являются целлюлозы I и II [28].

Целлюлоза I является наиболее распространенной структурой, встречающейся в природе. Она представляет собой смесь двух различных кристаллических форм: целлюлозы I<sub>α</sub>, имеющей триклинную одноцепочечную элементарную ячейку, в которой параллельные цепи целлюлозы удерживаются за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий с поступательным сдвигом, параллельным оси цепи; и целлюлозы I<sub>β</sub>, которая имеет моноклинную двухцепочечную элементарную ячейку, что означает укладку параллельных цепей целлюлозы с переменным сдвигом. При этом в обеих формах восстанавливающие концы направлены в одну сторону.

Для природной целлюлозы характерно аморфнокристаллическое состояние с несколькими типами организаций полисахарида: кристаллическая структура, аморфное состояние, поверхностная целлюлоза кристаллических доменов и паракристаллическая целлюлоза.

Целлюлоза II является наиболее термодинамически стабильной кристаллической формой, ее можно получить из целлюлозы I двумя различными путями: щелочной обработкой и регенерацией (солюбилизация и последующая рекристаллизация). Целлюлоза II, как и целлюлоза I<sub>β</sub>, имеет моноклинную элементарную ячейку. Различное расположение цепей (параллельное в целлюлозе I<sub>β</sub> и антипараллельное в целлюлозе II) является наиболее существенным различием между этими двумя полиморфами.

Показаны возможности взаимодействия целлюлозы с различными полисахаридами растительной клеточной стенки *in vitro*.

Целлюлоза способна ассоциировать с ксилоглюканом в растворе, при этом ассоциация зависит от pH (это говорит об участии водородных связей [29]), длины остова [30, 31] и состава боковых цепей ксилоглюкана [32, 33], а также от степени кристалличности целлюлозы.

С микрофибриллами целлюлозы способны связываться пектины, но только те, которые имеют арабинановые и галактановые боковые цепи; также установлено, что и изолированные цепи арабинана и галактана взаимодействуют с целлюлозой. Существует гипотеза, согласно которой

пектины могут служить «двойной связующей фазой», взаимодействуя с основными белками и полипептидами через гомогалактуроновые участки и с целлюлозой – через боковые цепи рамногалактуронана I [34].

Пектиновые вещества (пектины) представляют собой класс полисахаридов, ключевой особенностью которых является наличие в структуре остатков  $\alpha$ -D-галактуроновой кислоты. Выделяют несколько структурных подтипов пектинов: гомогалактуронан, рамногалактуронаны I и II. Также к пектинам можно отнести ксилогалактуронан и апиогалактуронан.

Гомогалактуронан (полигалактуроновая кислота, ПГК) – это линейный полисахарид, образованный мономерами  $\alpha$ -D-галактуроновой кислоты:  $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow]$ . Карбоксильные группы остатков GalA могут быть модифицированы, например, этерифицированы метилом, ацетилированы или амидированы (рисунок 1).

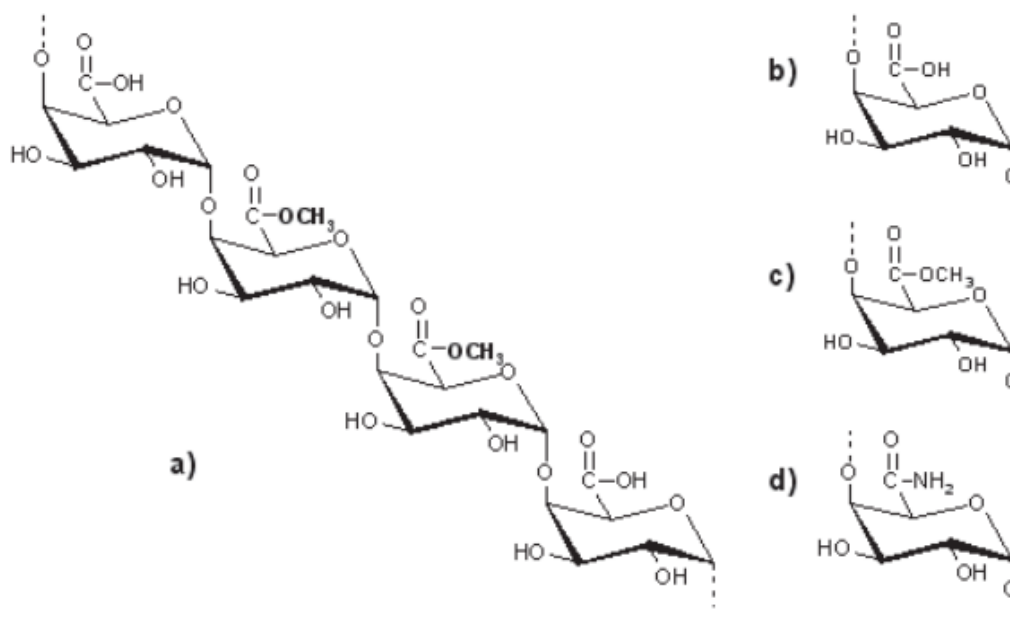


Рисунок 1 – Структура цепи гомогалактуронана (a) и типы модифицирующих групп, входящих в его состав: карбоксильная (b); метоксильная (c); амидная (d) [36]

Рамногалактуронаны I (РГ-I) выделяются в отдельный подкласс на основании того, что их остов образован чередующимися остатками галактуроновой кислоты и рамнозы:  $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap(1}\rightarrow ]$ .

Структура РГ-I широко варьирует как в различных растениях, так и в разных тканях одного растения и даже на разных стадиях развития одного растительного организма. Вариации могут проявляться в строении остова (соотношении и расположении мономеров), в длине, составе, структуре и расположении боковых цепей, а также в наличии и расположении модифицирующих групп.

Боковые цепи обычно представлены линейными или разветвленными галактанами и арабинанами, а также арабиногалактанами, ксило- и апиогалактуронаном и присоединены к рамнозе в положении О-4 (реже – О-3). Варианты модификации РГ-I включают в себя ацетилирование (как правило, по второму и третьему атому кислорода остатков галактуронановой кислоты, реже – по третьему кислородному атому рамнозы), метилирование остатков GalpA, а также замещение феруловыми группами остатков арабинозы и, реже, галактозы.

Рамногалактуронан II (РГ-II) – минорный компонент клеточной стенки, имеющий очень сложную, но достаточно консервативную структуру.

РГ-II представляет собой цепь гомогалактуронана длиной как минимум в семь мономеров  $\alpha\text{-D-GalpA}$ , к которой прикреплены четыре различные олигосахаридные цепи. [37]. Молекулы РГ-II поперечно связаны в димеры через атомы бора, причем показано, что процесс связывания самопроизвольно происходит *in vitro* без участия катализаторов. [38, 39]

Формирование разнообразных надмолекулярных структур ПГК изучено достаточно хорошо.

Высокометоксилированная (ВМ) ПГК (>50% остатков GalA в составе метилэтерифицировано) способна образовывать т.н. «кислые гели» за счет гидрофобных взаимодействий метиловых групп и создания водородных связей между карбоксильными и гидроксильными группами. Для

формирования гелей необходима кислая среда и присутствие низкомолекулярных углеводов (обычно сахарозы) [1].

Низкометоксилированная (НМ) ПГК (<50% остатков GalA в составе метилэтерифицировано) образует гели за счет сшивания ионизированных карбоксильных групп через бивалентные катионы, обычно  $\text{Ca}^{2+}$ . В этом случае не обязательно присутствие низкомолекулярных углеводов и кислотный pH. Такая сшивка молекул ПГК получила название «egg-box» (рисунок 2) [2].

Для улучшения гелеобразования низкометоксилированную ПГК амидируют. В таком случае помимо кальциевых сшивок структуру геля стабилизируют водородные связи между амидированными карбоксильными группами [3, 4].

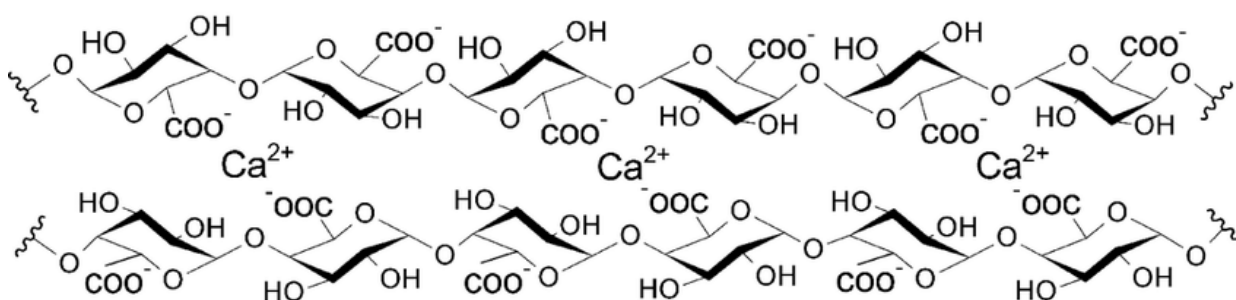


Рисунок 2 – Структура «egg-box», формируемая молекулами полигалактуроновой кислоты в присутствии ионов кальция [40]

Особенности формирования надмолекулярных структур рамногалактуронанами I, структура которых намного более вариабельна, изучено не так хорошо.

Показано, что РГ-I из желатинозных волокон льна, не содержащий фрагментов гомогалактуронана и имеющий длинные боковые цепи, состоящие в основном из галактана, способен образовывать в водном растворе агрегаты, причем энзиматическое укорочение цепей до средней длины ( $\text{Gal/Rha} \approx 5$ ) не приводит к изменению гидродинамического объема



агрегатов и только после экстремального укорочения в растворах появляются малые частицы, свидетельствующие о разрушении агрегатов [6]. Авторы предлагают модель строения таких агрегатов: образующие водородные связи галактановые цепи находятся в коровой зоне агрегатов, а отрицательно заряженные остовы молекул вытолкнуты наружу.

При АСМ-визуализации этого полисахарида выявляются компактные округлые и овальные объекты, часто с локальными возвышениями в середине [7]. Авторы предполагают, что эти возвышения могут быть местами взаимодействующих галактановых цепей.

Установлено, что этот рамногалактуронан способен образовывать гиперэластичные гели под действием микроволнового излучения [9]. Для успешного гелеобразования необходима концентрация около 4%, достаточно высокая степень полимеризации и отсутствие фрагментов ПГК в остове [8]. Предположительно, механизм гелеобразования заключается в перепутывании и увеличении возможностей взаимодействия боковых галактановых цепей, высвобожденных из агрегатов из-за закипания воды, заключенной внутри них.

Арабиноксиланы являются основными некрахмальными полисахаридами, присутствующими в злаках и травах. Арабиноксиланы имеют остов из  $\beta$ -(1,4)-связанных остатков ксилозы, которые замещены остатками арабинозы в положении О-2 и/или О-3. Отдельные звенья  $\alpha$ -L-арабинофуранозы и  $\alpha$ -D-глюкуроновой кислоты (и ее метилового эфира, 4-О-метил-глюкуроновой кислоты) являются наиболее частыми боковыми цепями, хотя ксилопиранозильные и галактопиранозильные остатки, связанные с арабинофуранозильными остатками, также обнаруживаются как короткие боковые цепи из 2-3 звеньев. Кроме того, в виде сложных эфиров встречаются уксусная, феруловая и оксикоричная кислоты.

Раствор ферулоилированного арабиноксиолана может загустевать и превращаться в гель под действием агентов, генерирующих свободные радикалы, таких как химические вещества (хлорид железа, персульфат

аммония) или ферментативные системы (перекись водорода/пероксидаза, линолевая кислота/липоксигеназа, лакказа/кислород) [41, 42, 43, 44, 45, 46]. Гелеобразование происходит в первую очередь в результате связывания цепей арабиноксилана через дегидродимеры феруловых кислот.

Структурные характеристики арабиноксилана играют определяющую роль в их гелеобразующей способности. Сравнение арабиноксиланов из разных источников показало, что высокое содержание феруловой кислоты, высокая молекулярная масса/гидродинамический объем и низкозамещенный ксилановый остов являются благоприятными свойствами для образования прочных гелей [47, 48, 49].

Хотя образование ковалентных поперечных связей является основным механизмом образования геля, было показано, что измеренная экспериментально жесткость геля больше, чем теоретически предсказанная из учета количества димеров и тетрамеров феруловой кислоты. Это указывает на то, что в формировании структуры геля могут играть роль дополнительные слабые взаимодействия, такие как водородные связи, ван-дер-ваальсовы взаимодействия и физическое запутывание цепей [50].

### **1.1.3. Углевод-углеводные взаимодействия полисахаридов *in vivo* и клеточная стенка как надмолекулярный полисахаридный ансамбль**

Изучение особенностей углевод-углеводных взаимодействий актуально не только в связи с многообразием практических применений, ряд которых будет рассмотрен в следующем пункте, но и для формирования фундаментальных представлений об организации и жизнедеятельности растительных клеток. Растительную клеточную клетку можно рассматривать как надмолекулярную структуру, образованную в большой степени полисахаридными составляющими, участвующими в углевод-углеводных взаимодействиях.

Основными молекулами, образующими клеточную стенку растений, являются целлюлоза, пектиновые вещества и связующие гликаны. В первичной клеточной стенке они, в совокупности со структурными белками, образуют три взаимодействующие, но относительно независимые трехмерные сети полимеров. Основная сеть состоит из микрофибрилл целлюлозы, связанных между собой различными гликанами (преимущественно за счет водородных связей). Вторая сеть состоит из пектиновых веществ, соединенных ионными связями через кальциевые мостики. Третья сеть представлена, как правило, структурными белками клеточной стенки, ковалентно связанными друг с другом и с другими компонентами стенки [51, 52].

В пользу модели клеточной стенки как надмолекулярной структуры выступают факты обнаружения определенных полисахаридов в разных фракциях при их экстракции. Так, например, ксилоглюкан частично извлекается обработкой специфичным ферментом ксилоглюканэндоглюканазой, что, предположительно, говорит о его физическом вплетении в клеточную стенку; часть ксилоглюкана извлекается обработкой щелочью – эти полимеры удерживаются в стенке водородными связями; еще часть выходит после обработки целлюлазой, что может означать тесную ассоциацию с микрофибриллами целлюлозы и даже частичное проникновение ксилоглюкана внутрь микрофибрилл [53]. Наличие ковалентных связей между отдельными полисахаридами клеточной стенки подтверждается их коэлюцией (при ионообменной хроматографии вместе с рамногалактуронаном I обнаруживается ксилоглюкан [54] или глюкоманнан [55]), либо выявляется биохимически (соединение двух молекул рамногалактуронана II через атом бора [38, 39], сшивание полимеров в димеры и тетрамеры с помощью феруловых мостиков [56, 57, 58]).

Состав и структура клеточных стенок варьирует как у различных растений и различных тканей одного растительного организма, так и в отдельных участках клеточной стенки индивидуальной клетки. Тем не менее,

выделяют четыре основных типа клеточной стенки (два типа первичной и два типа вторичной стенки), которые различаются, в первую очередь, составом полисахаридного матрикса. В первичной клеточной стенке первого типа основным связующим гликаном является ксилоглюкан, второго типа –  $\beta$ -D-глюкан со смешанным типом связей и арабиноксилан [52]. Во вторичной клеточной стенке первого типа почти единственным нецеллюлозным полисахаридом является ксилан, второго типа – галактозосодержащие полимеры [55].

Полисахариды, образующие клеточную стенку, начинают взаимодействовать сразу после завершения их синтеза или, в некоторых случаях, во время него. Целлюлоза синтезируется мультиферментным комплексом, расположенным на плазмалемме, а полисахариды матрикса – в аппарате Гольджи [59]. В создании надмолекулярной структуры клеточной стенки можно условно выделить пять стадий: 1) формирование микрофибрилл целлюлозы; 2) взаимодействие полисахаридов матрикса внутри субструктур аппарата Гольджи; 3) взаимодействие секретированных полисахаридов матрикса с формирующимися микрофибриллами целлюлозы после выплескивания содержимого пузырьков аппарата Гольджи за пределы плазмалеммы; 4) упаковка формирующихся комплексов и индивидуальных полисахаридов в слои клеточной стенки; 5) модификация отложенных слоев клеточной стенки [60].

1. Как было сказано ранее, в растительных клетках формируется целлюлоза I. Она создается мультиферментным комплексом, содержащим несколько десятков каталитических единиц, каждая из которых синтезирует одну молекулу целлюлозы. Выходящие из комплекса цепочки сразу кристаллизуются, образуя микрофибриллу, отдельные молекулы в которой связаны водородными связями, при этом молекулы могут начинаться и заканчиваться в разных местах. В аморфных частях отсутствует дальний порядок, сохраняется только общее направление молекул. Существуют предположения, что в аморфных областях микрофибрилл легче происходит

комплексообразующее взаимодействие целлюлозы с матричными полисахаридами [59, 61].

2. Матричные полисахариды синтезируются внутри аппарата Гольджи, и уже на этой стадии происходит их частичная модификация, нацеленная на обеспечение их будущего комплексообразования, а также непосредственное сшивание отдельных молекул. В аппарате Гольджи, к примеру, происходит метилирование уроновых кислот, что существенно влияет на их способность к гелеобразованию [62]. Здесь же к полисахаридам присоединяются остатки оксикоричных кислот, которые в дальнейшем обеспечивают ковалентные сшивки между полимерами клеточной стенки, а также начинается образование ковалентных сшивок с участием феруловой кислоты [63, 64]. Также показана способность отдельных полисахаридов аппарата Гольджи образовывать ковалентно связанные комплексы [65, 66].

При сливании пузырька Гольджи с плазмалеммой его содержимое распластывается по внутренней части клеточной стенки, под тургорным давлением протопласта вода из пузырьков вытекает в дальние слои клеточной стенки, и концентрация полисахаридов увеличивается, что способствует их спонтанному (не опосредованному ферментами) взаимодействию.

3. Спонтанные взаимодействия приводят не только к локализации полисахаридов матрикса на поверхности микрофибриллы, но и к попаданию некоторых полисахаридных цепей внутрь нее. Это возможно только во время, предшествующее кристаллизации микрофибриллы, т.е. требует наличия полисахаридов матрикса в непосредственной близости от целлюлозосинтазного комплекса. По всей видимости, происходит физический захват молекул нецеллюлозных полисахаридов во время формирования микрофибриллы целлюлозы. В качестве захваченных полисахаридов отмечают ксилоглюкан [67], рамногалактуронан I с длинными галактановыми цепями [68], а также полигалактуроновую кислоту [69]. Захваченные полисахариды могут изменять свойства микрофибрилл, а также

способствовать их взаимодействию с другими компонентами клеточной стенки [70].

#### 4. Упаковка полисахаридов в слои клеточной стенки.

Тургорное давление позволяет минимизировать зазор между плазмалеммой и внутренними слоями клеточной стенки, а также способствует проникновению «новых» полисахаридов в уже отложенные слои [71]. Микрометровая протяженность микрофибрилл целлюлозы обеспечивает закоривание нового материала. Также в закреплении полисахаридов в клеточной стенке существенную роль играет их сшивание с участием феруловой кислоты, а также трансгликозилазные реакции с участием уже встроенных в клеточную стенку молекул полисахаридов. Наиболее известен фермент ксилоглюканэндотрансгликозилаза, отщепляющий часть цепи одной молекулы ксилоглюкана и переносящий ее на другую [72].

5. Отложенные слои клеточной стенки могут подвергаться последующей реструктуризации. Один из примеров реструктуризации отложенных слоев клеточной стенки – трансформация клеточной пластинки, формируемой в ходе цитокинеза, в срединную пластинку (самый внешний слой клеточной стенки). Этот процесс сопровождается гидролизом каллозы – аморфного  $\beta$ -(1→3)-глюкана, составляющего основную массу клеточной пластинки, а также деметилированием полигалактуроновой кислоты, в результате чего формируется  $\text{Ca}^{2+}$ -пектатный гель, за счет которого растительные клетки соединены между собой [73].

### **1.1.4. Использование пектинов в системах доставки лекарств**

Биосовместимость, способность формировать агрегаты и гели, поведением которых можно управлять изменением условий среды или структуры молекулы, делает пектины привлекательным материалом для создания матриц, применяемых для адресной доставки лекарств.

Пектинат кальция может использоваться как нерастворимая гидрофильная оболочка таблеток, обеспечивая замедленное непрерывное высвобождение лекарства [74], либо лекарство может быть загружено в жидкой фазе в кальциевые гидрогели из НМ пектинов, которые затем дегидратируются [75]. Подобные ионотропные гели имеют повышенную стабильность в кислых средах (в желудке): часть карбоксильных групп, не связанных кальцием, протонируется, что препятствует электростатическому отталкиванию цепей ПГК. При щелочном же рН (в кишечнике) карбоксильные группы остаются в ионизированной форме, что способствует расширению гелевой сети и проникновению жидкости в систему [76]. Кроме того, ионы калия, которыми богата кишечная среда, могут конкурировать с ионами кальция и замещать их, разрывая места сшивки пектиновых молекул и способствуя деградации гелей в кишечнике [77].

Пектиновые матрицы используются в назальном спрее фентанила – анальгетика, который используется онкологическими пациентами с толерантностью к опиоидам. При попадании на слизистую оболочку носа аэрозольные капли НМ пектина, содержащие цитрат фентанила, взаимодействуют с присутствующими там ионами кальция, которые связываются с пектином и формируют гель, обеспечивая более долгое нахождение лекарства на месте аппликации [78].

Часто пектины используются в тандеме с другими полимерами, как синтетическими, так и природными.

Система таргетированной доставки ибупрофена в кишечник была предложена в исследовании [79]. Матрицы были получены из акриловой кислоты-соакриламида и пектина, соединенных с помощью свободнорадикальной полимеризации. Было показано, что такие матрицы чувствительны к рН, благодаря чему в них можно доставлять лекарства в кишечник, не теряя их в желудке. Были созданы цитосовместимые матрицы из химически сшитых пектина, молочной и метакриловой кислоты,

позволяющие доставлять противопухоловое вещество оксалиплатин в толстую кишку [80].

В качестве носителей коричневого альдегида были приготовлены желатин-пектиновые коацерваты, сформированные за счет электростатического взаимодействия отрицательно заряженных карбоксильных групп пектина и положительно заряженной поверхности желатина [81]. Коацерваты образовывались с высоким выходом, хорошим размером и морфологией при pH 4,23 при соотношении желатин/ВМ-пектин 3:1 и при pH 4,37 при соотношении желатин/НМ-пектин 6:1, что указывает на значительную роль ионной силы среды и степени метоксилирования пектина. Кроме того, полученная микроинкапсуляция показала значительно повышенную температуру разложения и эффективность инкапсуляции по сравнению с отдельными пектином и желатином. Полиэлектролитный комплекс пектина и желатина типа В был разработан для доставки куркумина [82].

Электростатические взаимодействия также могут использоваться в сочетании с технологиями 3D-биопечати. Лонг и др. разработали гидрогелевую раневую повязку на базе пектина и хитозана для доставки гидрохлорида лидокаина на основе технологий послойного нанесения и 3D-биопечати [83]. Полученные 3D-композитные каркасы показали хорошую пригодность для печати, а лиофилизированные раневые повязки сохраняли хорошую физическую целостность и гибкость. Кроме того, раневая повязка, напечатанная на 3D-принтере, обладала превосходной способностью абсорбировать экссудат и поддерживать влажную среду с высоким равновесным коэффициентом набухания 2832% и 2265% в отсутствие или в присутствии лекарственного средства соответственно. Гидрогель также показал значительную самоадгезию к коже. Более того, системы доставки лекарств обеспечивали быстрое, но контролируемое высвобождение лекарственного вещества в течение 5 часов.



Разработана серия химически сшитых инъекционных самовосстанавливающихся композитных гидрогелей в качестве средств доставки противоракового препарата. [84] Гидрогели с различными соотношениями окисленного пектина/хитозана и магнитными наночастицами  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  биосовместимы, обладают превосходными инъекционными, самовосстанавливающимися, магнитными и противораковыми свойствами, а также являются рН- и термочувствительными. Композитные гидрогели могут непрерывно высвобождать водорастворимый противораковый препарат в течение более 12 часов. Кроме того, добавление  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  может быть не только полезным для нацеливания, но и в совокупности усилить противораковые свойства препарата.

Еще один вариант композитных систем доставки был получен с нанотрубками галлуазита. Галуазит – глинистый минерал группы каолина с ложной трубчатой структурой, который привлекает внимание благодаря ряду преимуществ, включая биосовместимость, полую трубчатую морфологию, большую площадь поверхности и модифицируемую поверхность. Наночастицы на основе нанотрубок галлуазита, поверхность которых была модифицирована методом «слой за слоем» хитозаном и затем ВМ-пектином, были подготовлены для замедленного высвобождения фенитоина натрия. Полученные системы обладали биосовместимыми и рН-чувствительными характеристиками [85]. Загрузочная способность композитного препарата составила 34,6 мг/г, что выше, чем у чистых галлуазитных нанотрубок (18,3 мг/г).

Частицы металлов и оксидов металлов, проявляющие биомедицинскую активность, могут быть смешаны с пектином. Наночастицы золота, покрытые пектином, были изготовлены для доставки куркумина с помощью простого процесса смешивания [86]. Полученные частицы продемонстрировали сверхвысокое значение эффективности загрузки, составляющее не менее 96%, и великолепные характеристики замедленного высвобождения в условиях как кислой, так и щелочной моделируемой среды.

Кроме того, система доставки с куркумином показала антибактериальный эффект.

Все системы доставки, представленные выше, в качестве пектина используют полигалактуроновую кислоту с различным характером и степенью модификации остова, разработок же на основе рамногалактуронана I на данный момент несоизмеримо меньше.

Была показана возможность создания микрокапсул основе картофельного РГ-I без фрагментов ПГК в остове с использованием технологии обратной эмульсации. Обратная эмульсия осуществлялась путем ультразвукового смешивания водной фазы, содержащей РГ-I и хлорид натрия, с масляной фазой, состоящей из циклогексана и полирицинолеата полиглицерина. Стенка капсулы была сформирована посредством сшивки с участием гидроксильных групп РГ-I на границе раздела масло-вода с использованием толуолдиизоцианата в качестве сшивающего агента. Капсулы заполняли сульфородаминоом 101 (краситель) и тестировали на потенциальные свойства адресной доставки в желудочно-кишечный тракт. Высвобождения из микрокапсул не наблюдалось при воздействии желудочного сока, имитирующего состояние натощак, и лишь небольшое количество высвобождалось во время переваривания *in vitro* в условиях, имитирующих состояние кишечника натощак. Однако при воздействии смеси из четырех коммерческих ферментов, присутствующих в толстой кишке и расщепляющих РГ-I, капсулы открывались. Это говорит о том, что капсулы на основе РГ-I могут быть основой пероральной доставки лекарств в толстую кишку [87].

Была экспериментально подтверждена принципиальная возможность создания композиционных белково-полисахаридных гидрогелей на основе картофельного рамногалактуронана I и фибрина в качестве средства доставки противоопухолевой РНКазной биназы. Метод основан на ферментативной полимеризации фибрина в присутствии РГ с включением в гелевую сеть липосом, содержащих инкапсулированный ферментный препарат. Процесс

протекает в физиологических условиях, исключая воздействие высоких температур, органических растворителей и ультразвука на белковые компоненты. Имобилизация лечебного фермента биназы в матрице-носителе путем инкапсуляции его в липосомы из незаряженного липида позволила добиться его пролонгированного высвобождения с сохранением активности в течение длительного времени. Время высвобождения биназы из композитного носителя можно регулировать путем изменения концентрации фибрина и РГ-I [88].

## **1.2. Теоретические основы методов исследования организации и свойств полисахаридов и комплексов**

### **1.2.1. Динамическое рассеяние света**

Динамическое рассеяние света (ДРС), или фотонная корреляционная спектроскопия – оптический метод исследования нано- и микрочастиц в растворах, с помощью которого можно получать информацию о коэффициенте трансляционной диффузии частиц, размерах частиц, распределении частиц по размерам. Размер исследуемых частиц может составлять от 0,5 нм до нескольких микрон. При этом для разрешения частиц в полидисперсных образцах их размеры должны отличаться в 2-3 раза.

Метод ДРС основан на регистрации интенсивности света, рассеянного на частицах, взвешенных в растворе и совершающих броуновское движение. В результате хаотического движения частиц, диэлектрическая проницаемость среды и показатель преломления меняются случайным образом, что отражается на интенсивности рассеянного света. Более мелкие частицы движутся быстрее и вызывают более резкие флуктуации, большие, медленные, – более плавные. Прибор для определения ДРС регистрирует интенсивность рассеяния света во времени и на основе полученных данных вычисляет корреляционную функцию.

Временная корреляционная функция по определению:

$$G(\tau) = \langle I(0)I(\tau) \rangle \equiv \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T I(t)I(t + \tau) dt. \quad (1)$$

Здесь  $T$  – время накопления корреляционной функции,  $\tau$  – время задержки.

Нормированная временная корреляционная функция рассеянной интенсивности имеет вид

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle I(0)I(\tau) \rangle}{\langle I \rangle^2}. \quad (2)$$

Нормированная временная корреляционная функция рассеянного поля имеет вид

$$g^{(1)}(\tau) = \frac{\langle E^*(0)E(\tau) \rangle}{\langle I \rangle}. \quad (3)$$

Для оптических полей с гауссовым распределением и нулевым средним значением амплитуды напряженности эти две функции связаны соотношением Зигерта:

$$g^{(2)}(\tau) = A \left( 1 + \beta [g^{(1)}(\tau)]^2 \right). \quad (4)$$

Здесь  $\beta$  определяется степенью пространственной когерентности рассеянного света, а  $A$  – базовая линия.

В случае монодисперсного образца функция  $g^{(1)}(\tau)$  выражается единственной экспонентой:  $g^{(1)}(\tau) = e^{-\Gamma\tau}$ , где  $\Gamma = \frac{1}{\tau_c}$  – скорость спада (или релаксации), величина, обратная времени корреляции.

Для полидисперсных образцов из  $N$  видов частиц

$$g^{(1)}(\tau) = \int_0^\infty G(\Gamma) e^{-\Gamma\tau} d\Gamma, \quad (5)$$

где  $G(\Gamma)$  – функция распределения скоростей релаксации.

Экспериментально полученная корреляционная функция затем обрабатывается программными средствами, подбирается экспоненциальная

функция (или их сумма), которая лучше всего описала бы экспериментальные данные.

Степени экспонент содержат значения скоростей релаксации, которые однозначно связаны с коэффициентами диффузии частиц  $D$ :

$$\Gamma = Dq^2, \quad (6)$$

где  $q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$  – волновой вектор рассеяния.

Найдя коэффициент диффузии частицы, можно вычислить ее гидродинамический радиус по уравнению Эйнштейна-Стокса:

$$R = \frac{kT}{6\pi\eta D}, \quad (7)$$

где  $k$  – постоянная Больцмана,  $T$  – абсолютная температура,  $\eta$  – коэффициент вязкости растворителя.

### 1.2.2. Статическое рассеяние света

Метод статического рассеяния света (СРС) основан на угловой зависимости интенсивности света, рассеиваемой частицами различных размеров. Измеряя эту зависимость для растворов различной концентрации, а также зная оптические характеристики этих растворов и приборные константы, можно определить радиусы инерции частиц, их молекулярную массу и второй вириальный коэффициент.

Для сильно разведенных растворов частиц размером меньше  $\lambda/20$  рассеянная интенсивность не зависит от угла рассеяния, а зависит только от

оптической константы раствора  $K = \frac{4\pi^2 n^2 \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)^2}{\lambda^4 N_A}$ , его концентрации  $c$  и осмотического давления  $\pi$ .

$$I \sim KkT \frac{c}{\left(\frac{\partial \pi}{\partial c}\right)}. \quad (11)$$

Используя закон Вант-Гоффа, для идеального раствора можно записать:

$$\frac{\partial \pi}{\partial c} = \frac{kT}{M}. \quad (12)$$

Для неидеального раствора (в котором присутствует взаимодействие частиц с растворителем) это уравнение записывается в виде:

$$\frac{\partial \pi}{\partial c} = kT \left( \frac{1}{M} + 2A_2 \cdot c + \dots \right). \quad (13)$$

Здесь  $M$  – молекулярная масса частиц,  $A_2$  – второй вириальный коэффициент, характеризующий взаимодействие частиц с растворителем и между собой.

Измеряемое значение интенсивности из соотношения (11) содержит в себе константы, связанные с экспериментальной установкой. Поэтому вводится абсолютная интенсивность  $R$ , называемая отношением Рэлея, учитывающая величину рассеивающего объема  $V$ , расстояние от этого объема до детектора  $r_d$  и интенсивность  $I_0$ , рассеиваемую растворителем.

$$R = (I - I_0) \frac{r_d^2}{V}. \quad (14)$$

Комбинируя уравнения (11), (13) и (14), получаем уравнение Дебая для статического светорассеяния на малых частицах:

$$\frac{K \cdot c}{R} = \frac{1}{M} + 2A_2 \cdot c. \quad (15)$$

Рассеяние света на частицах, сравнимых по размеру с длиной световой волны (размерами от  $\lambda/20$  до  $\lambda/2$ ), уже не является независимым от угла. С учетом угловой зависимости уравнение (15) можно записать:

$$\frac{K \cdot c}{R} = \frac{1}{M \left( 1 - \frac{1}{3} r_g^2 q^2 \right)} + 2A_2 \cdot c. \quad (16)$$

Здесь

$$K = \frac{4\pi^2 n^2 \left( \frac{\partial n}{\partial c} \right)^2}{\lambda^4 N_A} - \text{оптическая константа};$$

$n$  – показатель преломления растворителя;

$\frac{\partial n}{\partial c}$  – инкремент показателя преломления раствора;

$\lambda$  – длина волны рассеиваемого излучения;

$N_A$  – постоянная Авогадро;

$c$  – весовая концентрация раствора;

$R$  – отношение Рэлея, позволяющее учесть приборные константы;

$M$  – молекулярная масса частиц;

$r_g$  – радиус инерции частиц;

$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$  – волновой вектор рассеяния;

$A_2$  – второй вириальный коэффициент.

Это уравнение, известное как уравнение Зимма, и лежит в основе метода статического светорассеяния.

В экспериментах по СРС детектируется интенсивность, рассеянная растворами нескольких концентраций под разными углами. Для пересчета полученных значений интенсивности в коэффициент Рэлея удобно пользоваться стандартным образцом с известным коэффициентом Рэлея. Измерив интенсивность рассеяния света таким стандартным образцом под заданным углом и зная  $R_{\text{станд}}$  для этого угла, а также делая поправку на темновой ток, можно вычислить коэффициент Рэлея для исследуемых частиц по формуле

$$R(\theta) = \frac{R_{\text{стандарт}}}{(I_{\text{стандарт}} - I_{\text{темновой}})} \cdot \frac{n_{\text{растворитель}}}{n_{\text{стандарт}}} \cdot (I_{\text{раствор}}(\theta) - I_{\text{растворитель}}(\theta)). \quad (17)$$

По полученным результатам строится диаграмма Зимма: экспериментальные точки отмечаются в координатах  $\frac{K \cdot c}{R}$  и  $\sin^2 \frac{\theta}{2} + a \cdot c$ , где  $a$  – масштабная константа, для удобства выбираемая так, чтобы  $a \cdot c_{\text{max}} \approx 1$  (рисунок 3).

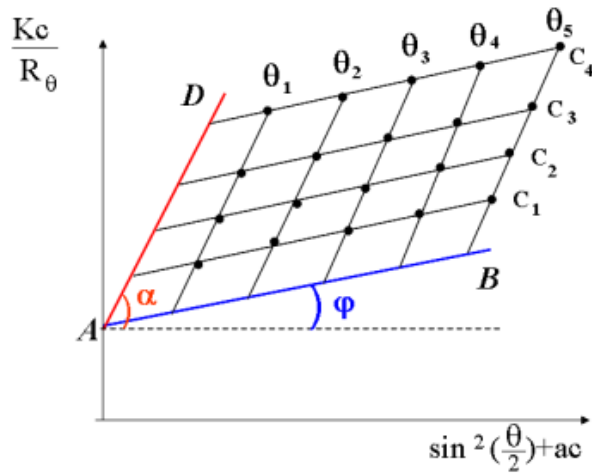


Рисунок 3 – Пример диаграммы Зимма

Проводя линейризацию уравнения (16) по  $q^2$  и ограничиваясь первыми двумя членами разложения, получаем

$$\frac{K \cdot c}{R} = \frac{1}{M} \left( 1 + \frac{1}{3} r_g^2 q^2 \right) + 2A_2 \cdot c, \quad (18)$$

или, расписывая  $q^2$ ,

$$\frac{K \cdot c}{R} = \frac{1}{M} \left( 1 + \frac{16\pi^2 n^2}{3\lambda^2} r_g^2 \sin^2 \frac{\theta}{2} \right) + 2A_2 \cdot c. \quad (19)$$

Прямая AD на диаграмме получена экстраполяцией данных к нулевому углу. По уравнению (19) видно, что тангенс угла наклона этой прямой равен удвоенному второму вириальному коэффициенту, а точка пересечения этой прямой с осью ординат определяет обратное значение молекулярной массы. Проводя экстраполяцию к нулевой концентрации, получаем прямую AB, угол наклона которой, согласно (19), определяет радиус инерции частиц.

Определив методом динамического светорассеяния гидродинамический радиус частиц в растворе, а методом статического светорассеяния – их радиус инерции, можно получить информацию о форме частиц. Для этого рассчитывается т.н. форм-фактор, равный отношению этих радиусов:



$$\rho = \frac{r_g}{r_h}. \quad (20)$$

Ниже приведены теоретически рассчитанные форм-факторы некоторых возможных топологий (таблица 1).

Таблица 1 – Форм-факторы некоторых полимерных топологий

Топология	Сплошная сфера	Эллипсоид	Полимерный клубок	Цилиндр длины l, диаметра D
Форм-фактор $\rho$	0.775	0.775 – 4	1.505	$\frac{1}{\sqrt{3}} \ln \left( \frac{l}{D} - 0.5 \right)$

### 1.2.3. Атомно-силовая микроскопия

Получение изображений в атомно-силовой микроскопии основано на регистрации силового взаимодействия между поверхностью исследуемого образца и зондом. В качестве зонда используется наноразмерное острие, расположенный на конце упругой балки, называемой кантилевером, при этом радиус кривизны острия и его форма подбирается в зависимости от задачи. Например, для визуализации отдельных молекул на слюде предпочтительнее использовать кантилеверы с вискерами – тонкими выростами, радиус кривизны которых достигает единиц нанометров, а для сканирования легкоповреждаемых мягких материалов, как клеточные стенки растений, выбирают кантилеверы со сферами радиусом около 150 нм на конце.

Между зондом и образцом действуют силы Ван-дер-Ваальса, модуль и знак которых зависит от расстояния между взаимодействующими телами: сближение дальше определенного порога вызывает отталкивание, а отдаление – притяжение. Таким образом, изменение рельефа поверхности вызывает изменение степени взаимодействия с ней кантилевера, что приводит к его изгибу. Для регистрации изгиба на кантилевер направлен лазерный луч, который в случае нейтрального положения кантилевера

отражается от поверхности балки в центр матрицы из четырех фотодиодов. Когда кантилевер испытывает действие сил в вертикальном направлении, отраженный лазерный луч смещается от центра, что регистрируется двумя фотодиодами, ответственными за это направление. Аналогично другая пара диодов регистрирует смещение отраженного луча при изгибе кантилевера под действием латеральных сил. Кантилевер перемещается вдоль поверхности с помощью пьезоэлектрической трубки, снимая характеристики поверхности поточечно.

Существует несколько разных режимов работы атомно-силового микроскопа, различающихся характером взаимодействия кантилевера с образцом и параметрами, которые регистрируются детектором: контактный и полуконтактный, также выделяют гибридный режим.

В контактном режиме кантилевер изгибается под действием сил отталкивания со стороны поверхности, при этом изгиб в случае твердого недеформируемого образца пропорционален силе отталкивания, а коэффициент пропорциональности зависит от жесткости кантилевера. В методе постоянной силы изгиб балки поддерживается на одном уровне системой обратной связи, и регистрируется перемещение сканера по оси  $Z$ , в методе постоянной высоты положение сканера по оси  $Z$  остается неизменным, и регистрируется степень изгиба балки. По зарегистрированным значениям восстанавливается рельеф поверхности. Преимуществами метода являются высокое разрешение изображений, а также возможность получать такие характеристики, как сила трения, сопротивление растекания и др. К недостаткам относится возможность повреждения образца, залипание кантилевера и действие латеральных сил.

В полуконтактном режиме кантилевер совершает периодические вертикальные колебания около поверхности образца, амплитуда колебаний меняется в зависимости от градиента сил, действующих на кантилевер со стороны поверхности. В режиме постоянной высоты информация о поверхности получается путем измерения амплитуды колебаний балки, в

режиме постоянной амплитуды топология характеризуется перемещением сканера по оси Z. Преимущество этого метода заключается в том, что он позволяет проводить неразрушающие исследования мягких материалов.

В гибридном режиме кантилевер также совершает колебания, но еще дополнительно перемещается вертикально с частотой, много меньшей частоты колебаний, для установления контакта с поверхностью и снятия силовых кривых. Таким образом можно получить характеристику таких локальных свойств образца, как модуль Юнга, электростатические и магнитные силы, адгезионные силы и др.

Полученные изображения в подавляющем большинстве случаев содержат компоненту, отражающую наклон поверхности образца относительно плоскости сканирования, из-за которой мелкие детали становятся малоразличимы. Для устранения этого эффекта при обработке методом наименьших квадратов подбирается плоскость  $P^{(1)}(x, y)$ , минимально отклоняющаяся от рельефа поверхности  $Z = f(x, y)$ , которая затем вычитается из изображения:

$$Z'_{ij} = Z_{ij} - P_{ij}^{(1)}. \quad (21)$$

Из-за нелинейного движения сканера изображения представляют собой суперпозицию реального рельефа и некоторой поверхности второго (а часто и более высокого) порядка. Для устранения подобных искажений методом наименьших квадратов подбирается поверхность с минимальными отклонениями от исходной функции  $Z = f(x, y)$ , и затем вычитается из исходного изображения:

$$Z'_{ij} = Z_{ij} - P_{ij}^{(2)}. \quad (22)$$

Одно из значительных ограничений на качество и разрешение получаемых изображений накладывает конечный размер рабочей части используемых зондов: изображения объектов, размеры которых сравнимы с размером иглы кантилевера, сильно искажаются. Фактическое изображение представляет собой «свертку» иглы и сканируемой поверхности. Наиболее

эффективным методом реконструкции поверхности является метод численной деконволюции, в котором используется форма иглы, экспериментально полученная путем сканирования структур с известной топографией поверхности. Восстановление исходного рельефа поверхности в этом осуществляется обратным преобразованием: изображение поверхности повторно (но уже численно) инвертированным зондом.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Объекты исследования

Для экспериментов использовались следующие препараты и вещества:

- коммерческий препарат НМ ПГК (низкометоксилированный яблочный пектин АРА 311, Andre Pectin, Китай);
- коммерческий препарат амидированная НМ ПГК (низкометоксилированный амидированный яблочный пектин АРА 230, Andre Pectin, Китай);
- коммерческий препарат ВМ ПГК (высокометоксилированный яблочный пектин АРА 103, Andre Pectin, Китай);
- урсодезоксихолевая кислота (Урсосан, таблетки 250 мг, ПРОМЕД ЦС ПРАГА, ЗиО-Здоровье ЗАО, Россия).
- коммерческий препарат ПГК (цитрусовый пектин, Megazyme, Ирландия);
- коммерческий препарат РГ-I с боковыми галактановыми цепями и фрагментами гомогалактуронана в остове (картофельный пектин, Megazyme, Ирландия);
- РГ-I с боковыми галактановыми цепями, выделенный из волокон льна;

### 2.2. Получение, очистка и биохимический анализ пектиновых полисахаридов на базе рамногалактуронанового остова

Объектом для получения рамногалактуронанов I с боковыми галактановыми цепями служили растения льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) сорта Могилевский из коллекции ВНИИ льна (г. Торжок).

Получение рамногалактуронана I из волокон льна достигалось путем его высвобождения из клеточной стенки волокон после полного разрушения микрофибрилл целлюлозы согласно разработанному ранее в лаборатории протоколу [68].

Для получения рамногалактуронана I из клеточной стенки использовали пучки зрелых волокон высушенных растений льна на стадии желтой спелости. Изолированные пучки волокон аккуратно измельчали в ступке с избытком воды. Гомогенат промывали ацетоном и кипятили в смеси хлороформа и этанола (1:2). Рамногалактуронан I после встраивания в клеточную стенку выделяли как полимер, прочно удерживаемый микрофибриллами целлюлозы. Для удаления матриксных полисахаридов, слабо удерживаемых микрофибриллами целлюлозы гомогенат кипятили на водяной бане в 1% оксалате аммония (pH 5.0) в течение 1 ч с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 10000 об/мин; полученный осадок растворяли и выдерживали в 4 М КОН + 3% H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> в течение 2 ч с последующим центрифугированием в течение 6 мин при 10000 об/мин. Все супернатанты удаляли. Осадок отмывали водой до нейтрального pH.

Прочно удерживаемые микрофибриллами целлюлозы полисахариды получали по методике, основанной на обработке целлюлозы органическим растворителем, способствующим переходу нативной целлюлозы I в целлюлозу II, подвергающейся гидролизу целлюлазой. Для полного разрушения микрофибрилл целлюлозы использовали 8% раствор LiCl (Merck, Германия) в обезвоженном на молекулярных ситах (4Å, Sigma, Германия) N,N-диметилацетамиде (AppliChem, Германия) и целлюлазу (Cellusoft-L; Novo Nordisk Bioindustriie S.A., Франция; 750 EGU/G).

Навеску LiCl (40 г) сушили при 180°C в течение 4-5 ч, добавляли 500 мл обезвоженного на молекулярных ситах ДМА и растворяли на шейкере в течение ночи. Осадок, полученный после обработки 0.5% оксалатом аммония и 4 М КОН (5 г), отмывали водой в течение часа и дважды ацетоном в течение 40 мин. Полученный материал, содержащий целлюлозу и прочно

удерживаемые целлюлозой полимеры, заливали 50 мл ДМА на 1 ч, затем центрифугировали и заливали свежей порцией ДМА (50 мл) и выдерживали на шейкере в течение ночи. После чего, раствор центрифугировали и растворяли полученный осадок в растворе ДМА с LiCl на шейкере в течение 3 суток. Полученный раствор по каплям приливали в воду из соотношения вода:раствор – 1:1 и перемешивали. Смесь выдерживали ночь на шейкере, а затем промывали водой 4 раза. Объединенные супернатанты собирали, диализовали в мешках с диаметром пор 12 000 и концентрировали на роторном испарителе при температуре воды в водяной бане 50-60°C (ДМА I).

Осадок, оставшийся после отделения фракции ДМА I, гидролизовали целлюлазой (Cellusoft-L; Novo Nordisk Bioindustrielle S.A., Франция; 750 ед. акт./г) в течение 48 ч, при 37°C (ДМА II). Инкубацию проводили в 250 мл 0.01 М NaOAc буфере с добавлением 0,02% NaN<sub>3</sub> (pH 5.2), объем целлюлазы – 0.5 мл. Процедуру проводили дважды. Фермент инактивировали кипячением раствора на водяной бане в течение 5 мин. Фракции ДМА I и ДМА II объединяли и обессоливали на колонке с сефадексом G25 (19×400 мм, Pharmacia, Швеция, скорость элюирования 1.1 мл/мин) по схеме: сбор 20 мл после 28 мл слива (фракция полимеров, прочно удерживаемых микрофибриллами целлюлозы).

Очистку рамногалактуронана I, составляющего основной объем полученной фракции полимеров, проводили с помощью гель-фильтрации на колонке с сефарозой CL-4B (12 × 400 мм, Pharmacia, Швеция) с эффективной областью разделения для полисахаридов в диапазоне масс от 30 до 2000 кДа. Элюцию проводили 0.01 М раствором пиридина и уксусной кислоты. Скорость элюирования 0.25 мл/мин. Объем собираемых фракций 1 мл. Посторонние хроматограмм осуществляли по соотношению объема элюции и содержанию углеводов во фракциях. Содержание углеводов определяли с помощью фенол-сернокислого метода Дюбуа [89], исходя из значений оптической плотности каждой фракции при 490 нм.

Область выхода рамногалактуронана I приходилась на 5-26 мл элюции после 8 мл свободного объема колонки, что соответствовало диапазону молекулярных масс 100-400 кДа. Объединенные фракции (5-26) высушивали на роторном испарителе досуха при температуре воды в водяной бане 50-60°C. Для всех дальнейших экспериментов образец перерастворяли в деионизованной воде.

### **2.3. Получение порошка УДХК**

Таблетки урсосана расталкивались в порошок с помощью ступки и пестика. Полученный порошок растворялся в 95% этиловом спирте, центрифугировался, надосадочная жидкость отделялась. Далее к полученному раствору добавлялась деионизованная вода до выпадения УДХК в осадок, и раствор высушивался до получения порошка. Степень чистоты полученной УДХК оценивалась с помощью хроматографии.

### **2.4. Приготовление таблеток из ПГК с загруженной УДХК**

Для приготовления таблеток с загруженной УДХК из НМ и амидированной НМ ПГК в порошковой форме перемешивались 450 мг пектина, 56,25 мг  $\text{CaCl}_2$  и 250 мг УДХК. Для приготовления таблеток с загруженной УДХК из ВМ ПГК в порошковой форме перемешивались 350 мг пектина и 250 мг УДХК. Для приготовления контрольных таблеток из НМ и амидированной НМ ПГК 700 мг пектина перемешивались с 87,5 мг  $\text{CaCl}_2$ . Контрольная таблетка из ВМ ПГК состояла только из 600 мг пектина.

Таблетки прессовались таблеточным прессом TDP-5N (LFA Tablet Presses, Тайвань) с аркообразной матрицей диаметром 12 мм и силой прессования 50 кН.



## **2.5. Эксперименты по pH-зависимому высвобождению УДХК из пектиновых таблеток**

В качестве сред, имитирующих желудочно-кишечный тракт, были использованы 0,1 н HCl (pH 1,2-1,5, имитация желудка) и 0,1 н KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6,8-7,5, имитация тонкого кишечника). Инкубация таблеток в имитированных средах производилась в шейкере-инкубаторе при температуре 36-37<sup>0</sup>С и перемешивании с частотой 200 об/мин.

Эксперименты для всех видов таблеток проводились по схеме: таблетки попадают в «желудок» (20 мл 0,1 н HCl, pH 1,2-1,5), проводят там 3 часа, гомогенат после эрозии таблетки отбирается, неразрушенная часть таблетки отправляется в «кишечник» (20 мл 0,1 н KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,8-7,5) на 3 часа; далее на анализ также отбирается гомогенат. Отбор проб из имитирующих сред проводился каждые 30 мин. Для анализа выхода УДХК отбиралось по 0,8 мл гомогената.

## **2.6. Анализ выхода УДХК методом обращенно-фазовой хроматографии**

Образцы гомогената, отобранные на предыдущем этапе, центрифугировались, осадок растворялся в 0,8 мл метанола, снова центрифугировался, и для разделения и оценки содержания высвобожденной УДХК отбиралось 0,2 мл надосадочной жидкости.

Для изучения высвобождения УДХК из таблеток использовалась обращенно-фазовая хроматография (система Agilent 1260 Infinity). Разделение проводилось на колонке Zorbax ODS (2,1 × 250 мм) (Agilent, Германия). Для элюции использовалась ультра-чистая вода 1 типа (18 МОм, 0,055 мкСм/см, очистка на системе H<sub>2</sub>O-MA-UV-T Arrium mini-plus, Sartorius, Германия) и метанол (чистый для ВЭЖХ, >99,9%, Sigma-Aldrich, США) скорость потока – 0,9 мл/мин, температура колонки – 20<sup>0</sup>С. Элюция производилась с использованием градиентов схеме: 0-5 мин – 100% вода, 5-6

мин – 0-80% метанол, 100-20% вода, 6-11 мин – 80% метанол, 20% вода, 11-16 мин – 80-0% метанол, 20-100% вода, 17-20 мин – 100% вода. Для определения содержания компонентов в образцах и установления их времени выхода использовался диодно-матричный детектор Agilent 1260 Infinity (Agilent, Германия), детекция производилась на длине волны 210 нм (опционно также снимался полный спектр поглощения). Для получения хроматограмм, отражающих выход УДХК, из хроматограмм образцов загруженных таблеток вычитались соответствующие хроматограммы контрольных таблеток без загруженной УДХК. Для получения калибровочной кривой навески порошка УДХК растворялись в чистом метаноле в пяти концентрациях от 0,5 мг/мл до 5 мг/мл, и разделялись хроматографически при тех же условиях элюции, для корректности оценки показателей для УДХК из площадей пиков на хроматограммах вычитались площади соответствующих пиков на хроматограмме чистого метанола.

## **2.7. Эксперименты по динамическому и статическому рассеянию света пектинами различных структурных типов**

Для экспериментов использовался коммерческий препарат ПГК (цитрусовый пектин, Megazyme, Ирландия), коммерческий препарат кРГ-I (картофельный рамногалактуронан I с фрагментами гомогалактуронана в остове) (Megazyme, Ирландия), а также лРГ-I (льняной рамногалактуронан I с боковыми галактановыми цепями). Для растворения образцов использовалась ультра-чистая вода 1 типа (0,055 мкСм/см, очистка на системе H<sub>2</sub>O-MA-UV-T Arium mini-plus, Sartorius, Германия). Образцы фильтровались через мембранные фильтры из политетрафторэтилена с размером пор 0,22 мкм (PTFE-20) производителя Millipore (Merck, Германия) и мембранные фильтры на основе оксида алюминия с размером пор 20 нм (Anotop) производителя Whatman (Merck, Германия).

Эксперименты по динамическому и статическому рассеянию света проводились с помощью мультиуглового спектрометра Photocor Complex (Photocor Instruments Inc., Россия), оснащенного полупроводниковым лазером с длиной волны  $\lambda = 657$  нм, коррелятором Photocor FC, термоэлектрическим модулем (диапазон температур  $10^{\circ}\text{C} - 90^{\circ}\text{C}$ , погрешность  $0.1^{\circ}\text{C}$ ) и гониометром, позволяющим снимать рассеяние под углами  $10^{\circ} - 150^{\circ}$  с погрешностью  $0.01^{\circ}$ . Во всех экспериментах по статическому светорассеянию снимались корреляционные функции и интенсивности света, рассеянного растворами изучаемых образцов различных концентраций под углами  $30^{\circ}, 40^{\circ}, 50^{\circ}, 70^{\circ}, 90^{\circ}, 110^{\circ}, 130^{\circ}, 140^{\circ}, 150^{\circ}$  при температуре  $20^{\circ}\text{C}$ . В случае динамического светорассеяния корреляционные функции снимались только под углом  $140^{\circ}$ . Корреляционная функция копилась 30 секунд, всего делалось 30 повторностей. Полученный массив функций фильтровался с отклонением 0,005 по базовой линии и толерантности к выпадкам по интенсивности в 20%, строилась усредненная корреляционная функция, которая и анализировалась далее в программе DynaLS с помощью алгоритма CONTIN для получения информации о гидродинамических радиусах частиц.

В экспериментах по статическому светорассеянию по значениям интенсивностей рассеяния света образцами РГ-I и водой (нулевая концентрация) строилась модель Зимма. Для построения использовались следующие параметры: показатель преломления толуола и воды – 1,497 и 1,332 соответственно; инкремент показателя преломления раствора – 0,17 мл/г; температура – 293 К; вязкость раствора – 1 мПа·с; коэффициент Рэлея для толуола –  $1,1416 \cdot 10^3 \text{ м}^{-1}$ ; интенсивность рассеяния света для толуола (усредненная по заданным углам) – 86135; темновой ток – 429; длина волны света – 657 нм.

ПГК. 40 мг ПГК было растворено в 2,5 мл воды, раствор был очищен от низкомолекулярных примесей на колонке с сефадексом G-25 (PD-10, Pharmacia, Швеция) и сконцентрирован до 2 мл. Был измерен pH раствора – исходный pH = 5,97.

Раствор полисахарида (1 мл) был пропущен через фильтр PTFE-20 в кювету для светорассеяния. Для данной концентрации корреляционные функции снимались под углом  $140^\circ$  и обрабатывались, как описано выше. Далее серией разведений готовились и изучались таким образом растворы с другими концентрациями; всего было снято 5 растворов с концентрациями от 0,72 до 1,62 мг/мл. Из каждого раствора отбиралось 40 мкг углеводов (из расчета от исходной концентрации до фильтрования) для определения точной концентрации после пропускания через фильтр.

В оставшийся миллилитр раствора была добавлена ледяная уксусная кислота для доведения pH до 3,61. Эксперименты по светорассеянию проводились аналогично предыдущему случаю, было снято 5 концентраций в диапазоне 0,5-1,5 мг/мл. Из растворов так же отбиралось по 40 мг углеводов для уточнения концентрации.

кРГ-I. 30 мг картофельного рамногалактуронана I было растворено в 2,5 мл воды, раствор был очищен от низкомолекулярных примесей на колонке с сефадексом G-25 (PD-10, Pharmacia, Швеция), высушен и перерастворен в 1,5 мл воды. 1 мл полученного раствора был пропущен через фильтр PTFE-20 в кювету для светорассеяния. Для данной концентрации снимались корреляционные функции и значения интенсивностей в зависимости от угла, как описано выше. Далее серией разведений готовились и изучались таким образом растворы с другими концентрациями; всего было снято 9 растворов с концентрациями от 0,14 до 1,43 мг/мл. Из каждого раствора отбиралось 40 мкг углеводов (из расчета от исходной концентрации до фильтрования) для определения точной концентрации после пропускания через фильтр.

С целью избавиться от больших частиц, раствор картофельного рамногалактуронана I был пропущен через фильтр Anotop с размером пор 20 нм. Для этого готовился водный раствор кРГ-I, очищенного, как в предыдущем случае, на колонке с сефадексом G-25, объемом 30 мл и с концентрацией 5 мг/мл. Далее этот раствор был пропущен через фильтр

PTFE-20 и затем через Anotop. После этого раствор концентрировался на лиофильной сушке до 10 мл и фильтровался повторно через Anotop в кювету для светорассеяния. Эксперименты по светорассеянию проводились аналогично предыдущим, было снято 5 концентраций от 0,48 до 0,97 мг/мл.

лРГ-I. 1 мл предварительно очищенного на G-25 раствора льняного РГ-I с концентрацией 3,7 мг/мл был пропущен через фильтр PTFE-20 в кювету для светорассеяния. Для данной концентрации снимались корреляционные функции и значения интенсивностей в зависимости от угла, как описано выше. Далее серией разведений готовились и изучались таким образом растворы с другими концентрациями; всего было снято 4 раствора с концентрациями от 0,67 до 1,34 мг/мл. Из каждого раствора отбиралось 40 мкг углеводов (из расчета от исходной концентрации до фильтрования) для определения точной концентрации после пропускания через фильтр.

Для того, чтобы избавиться от больших частиц, раствор льняного рамногалактуронана I с концентрацией 3,7 мг/мл объемом 30 мл был профильтрован через PTFE-20 и Anotop аналогично предыдущему эксперименту с кРГ-I и сконцентрирован до 5 мл на лиофильной сушке. 1 мл полученного раствора был профильтрован повторно через Anotop в кювету для светорассеяния. Далее эксперименты по светорассеянию проводились аналогично предыдущим, было снято 5 концентраций от 0,1 до 0,44 мг/мл.

## **2.8. Атомно-силовая микроскопия пектинов различных структурных типов**

ПГК была растворена в деионизированной воде в концентрации 1 мг/мл и обессолена на колонке Sephadex G-25 (Pharmacia, Sweden). Растворы льняного и картофельного РГ-I были взяты после экспериментов по светорассеянию, описанных на предыдущем этапе работы, перед которым они также были обессолены на колонке Sephadex G-25. Оба образца были пропущены через фильтры из политетрафторэтилена с размером пор 220 нм

и фильтры на основе оксида алюминия с размером пор 20 нм. Концентрация углеводов во всех растворах была измерена методом Дюбуа [89], после чего они были разбавлены до концентрации 1 мкг/мл. Каждый раствор был пропущен через фильтр из политетрафторэтилена с размером пор 0,45 мкм. Пять микролитров отфильтрованного раствора наносили на свежесколотую слюду (среднеквадратичная шероховатость 0,07 нм). Каплю раствора полисахарида на слюде высушивали в чашке Петри при комнатной температуре на протяжении ночи.

Эксперименты проводили при относительной влажности 30-45% и температуре 22-25°C на приборе ИНТЕГРА Прима (НТ-МДТ, Россия). Образцы сканировали в полуконтактном режиме с использованием кантиллеров NSG10 (TipsNano, Эстония) с резонансной частотой 240 кГц, указанной силовой постоянной 11,8 Н/м и радиусом острия иглы 10 нм. Частота сканирования составляла 1 Гц.

АСМ-изображения анализировали в автономном режиме с помощью программы Nova P<sub>x</sub> 3.4 (НТ-МДТ, Россия). Для анализа использовались изображения в высотном режиме. Корректировка подгонки горизонтальной линии и вычитание плоскости второго порядка были выполнены для улучшения отношения сигнала к шуму и устранения эффекта изгиба поверхности. Геометрические параметры (площадь, высота, длина, ширина и объем) были извлечены из сканов площадью 5 мкм<sup>2</sup>.

Параметры объектов рассчитывались пороговым методом. В этом методе изображение АСМ разрезается плоскостью на определенной высоте (пороговый уровень), параллельной базовой плоскости (нулевой уровень). Все точки изображения, высота которых превышает пороговый уровень, считаются принадлежащими локальным объектам. Связанные пиксели группируются и интерпретируются как один объект. Для каждого изображения пороговый уровень настраивался индивидуально; он был постепенно увеличен, начиная с нулевого уровня, чтобы включить максимальное количество пикселей, принадлежащих объектам, но не

фоновых пикселей.

Все геометрические параметры рассчитывались на пороговом уровне. Площадь объекта рассчитывалась как площадь, занимаемая пикселями, объединенными в один объект. Объем объекта рассчитывался как объем выше порогового уровня. Представленные значения высоты являются средним значением высоты, найденным для всех пикселей каждого объекта. Длины объектов овальной формы рассчитывали как более длинную сторону объектов, ширину – как более короткую. Длину линейных объектов измеряли вручную с помощью инструмента линии. Всего было обработано по 200 объектов в случае кРГ-I, лРГ-I и округлых объектов ПГК и 50 объектов в случае линейных объектов ПГК.

## **2.9. Определение содержания углеводов в образцах**

Точная концентрация углеводов в образцах определялась фенол-сернокислотным методом Дюбуа, основанном на образовании при окислении пентоз и гексоз фурфурола и оксиметилфурфурола с последующей их конденсацией с фенолом и образованием окрашенного в желтый цвет комплекса. Отобранный из каждого образца объем, содержащий 40 мкг углеводов, доводился водой до объема 0,2 мл, затем добавлялось 0,2 мл 5% фенола и 1 мл серной кислоты. Также готовилась контрольная смесь, не содержащая углеводов: к 0,2 мл воды приливалось 0,2 мл 5% фенола и 1 мл серной кислоты. Каждая смесь перемешивалась и оставалась стоять на 10 минут при комнатной температуре. Затем смеси кипятились на водяной бане в течение 15 минут и остужались. Измерялась оптическая плотность каждой смеси при 490 нм, после чего по заранее построенной калибровочной кривой рассчитывались истинные концентрации углеводов в образцах. Измерения проводили в двух повторностях для каждого анализируемого образца.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Для достижения цели работы – разработки безопасных пектиновых матриц для доставки УДХК в тонкий кишечник – исследования велись по двум направлениям: 1) создание лекарственных форм на основе ПГК, свойства и возможности которой уже довольно хорошо изучены; 2) изучение особенностей формирования пектинами надмолекулярных структур в зависимости от их строения для расширения спектра пектинов, пригодных для выполнения поставленной цели. Общая схема экспериментов представлена ниже (рисунок 4).

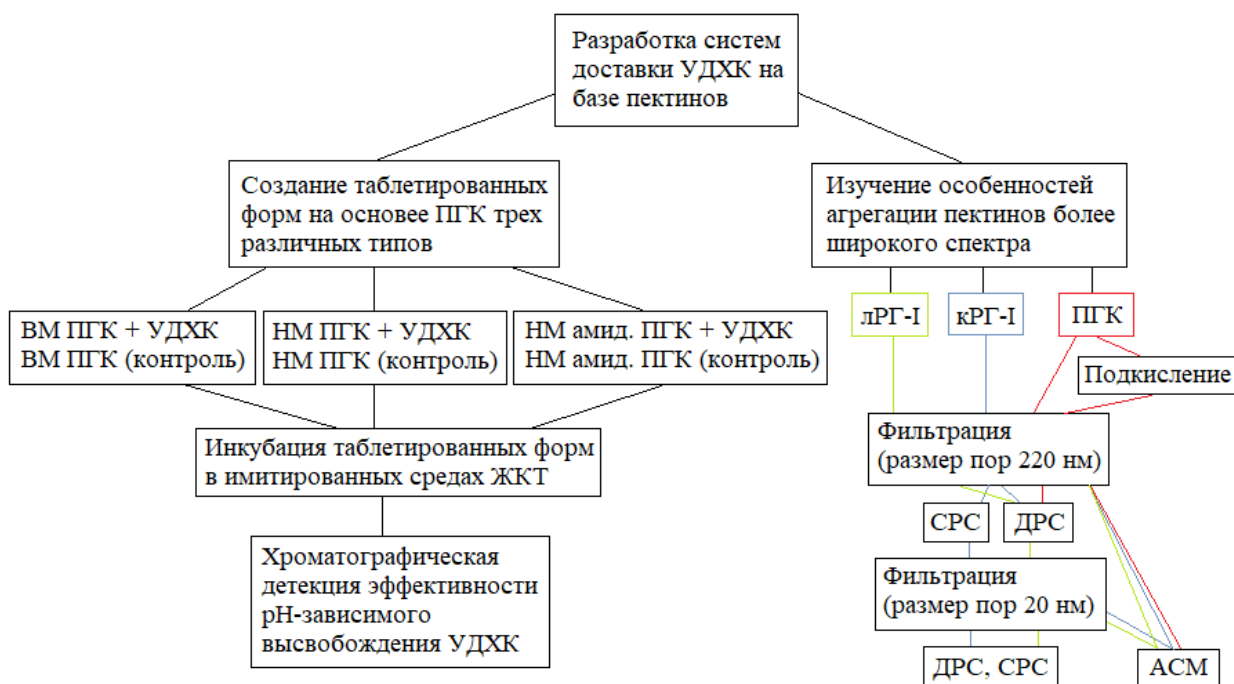


Рисунок 4 – Общая схема работы

### 3.1. Оценка выхода УДХК из таблеток с ПГК трех различных типов

В рамках работы были приготовлены таблетированные формы с загруженной УДХК из трех различных типов полигалактуроновой кислоты:



высокометоксилированной, низкометоксилированной и амидированной низкометоксилированной (рисунок 5).

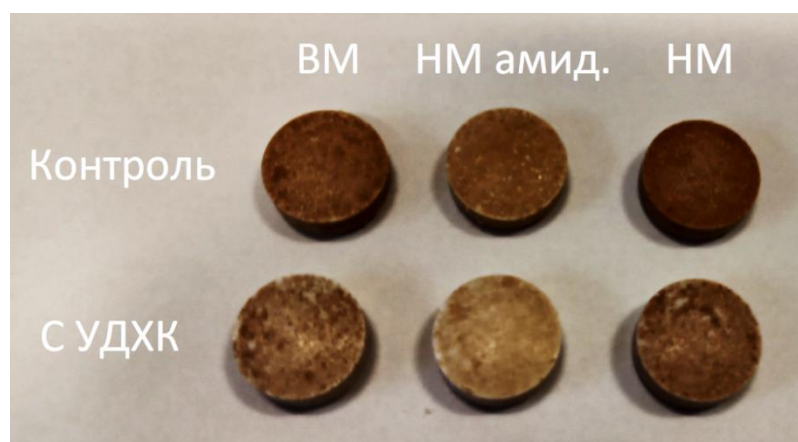


Рисунок 5 – Таблетированные формы на основе ПГК различных типов с загруженной УДХК и без УДХК (контроль)

Была оценена динамика выхода УДХК из этих таблеток в средах, имитирующих рН желудка и кишечника (рисунок 6). В экспериментах по высвобождению УДХК таблетированные формы на основе различных типов ПГК показали различную эффективность удерживания лекарственного средства.

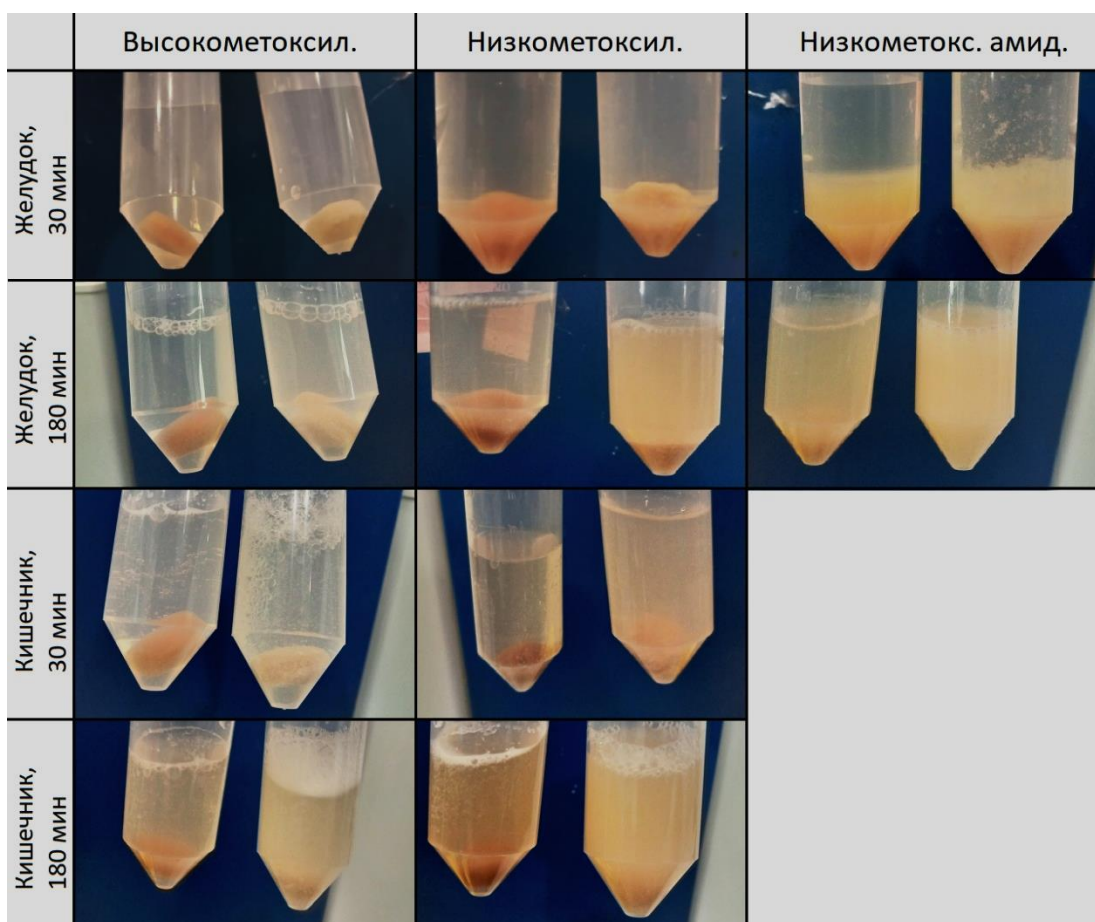


Рисунок 6 – Таблетки, инкубируемые в средах, имитирующих ЖКТ.  
Справа на каждой фотографии – контроль, слева – таблетки с УДХК

### 3.1.1. Выход УДХК из высокометоксилированной ПГК

Таблетка с ВМ ПГК высвобождает около 20% УДХК в «желудке» почти сразу и в дальнейшем продолжает постепенно ее высвобождать, выпуская еще 10% к концу пребывания в среде (рисунок 7). В «кишечнике» высвобождение ускоряется, к концу инкубации высвобождается около 60% УДХК. Гелеобразование ВМ ПГК напрямую связано с кислотностью среды, поэтому логично, что после помещения в «кишечник» с щелочным рН таблетка разрушается и высвобождает УДХК быстрее.

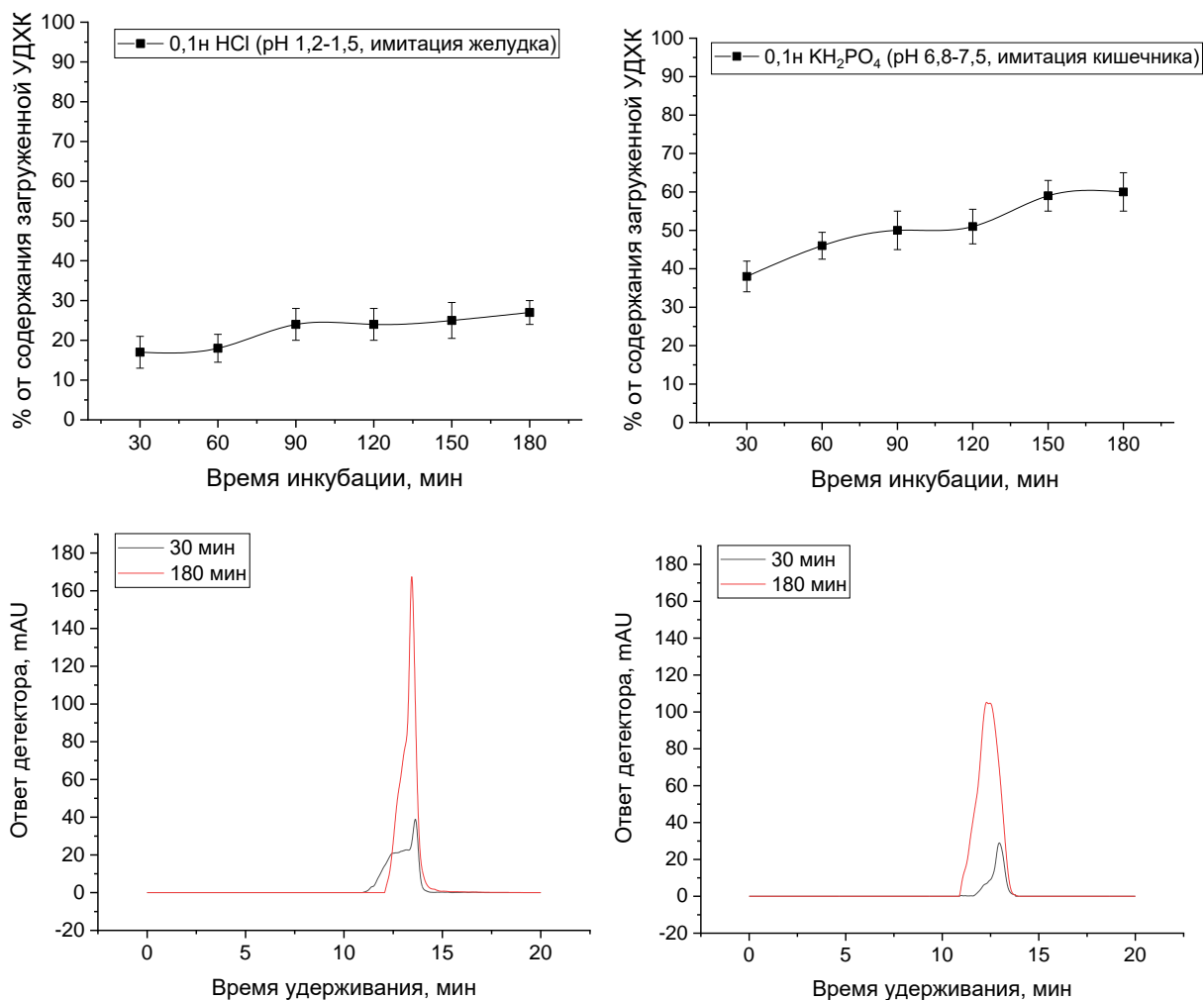


Рисунок 7 – Динамика pH-зависимого высвобождения УДХК из таблетированной формы на основе высокометоксилированной ПГК. Под каждым графиком изображены хроматограммы, соответствующие первой и последней временной точке инкубации в имитированных средах ЖКТ

### 3.1.2. Выход УДХК из низкометоксилированной ПГК

В случае таблеток с неамидированной НМ ПГК, около 20% УДХК также выходит почти сразу после помещения в «желудок», но затем доля высвобожденной УДХК почти не увеличивается до самого конца пребывания в этой среде (рисунок 8). Возможно, УДХК, расположенная близко к поверхности таблетки, выходит в среду, и поверхностные молекулы ПГК связываются в гель, покрывающий таблетку и препятствующий дальнейшему выходу УДХК. В «кишечнике» УДХК высвобождается, но частично (всего

13%) и очень медленно. Это может быть следствием того, что гелеобразование НМ ПГК завязано на химической сшивке молекул через ионы кальция и не зависит от кислотности среды, в отличие от гелеобразования ВМ ПГК.

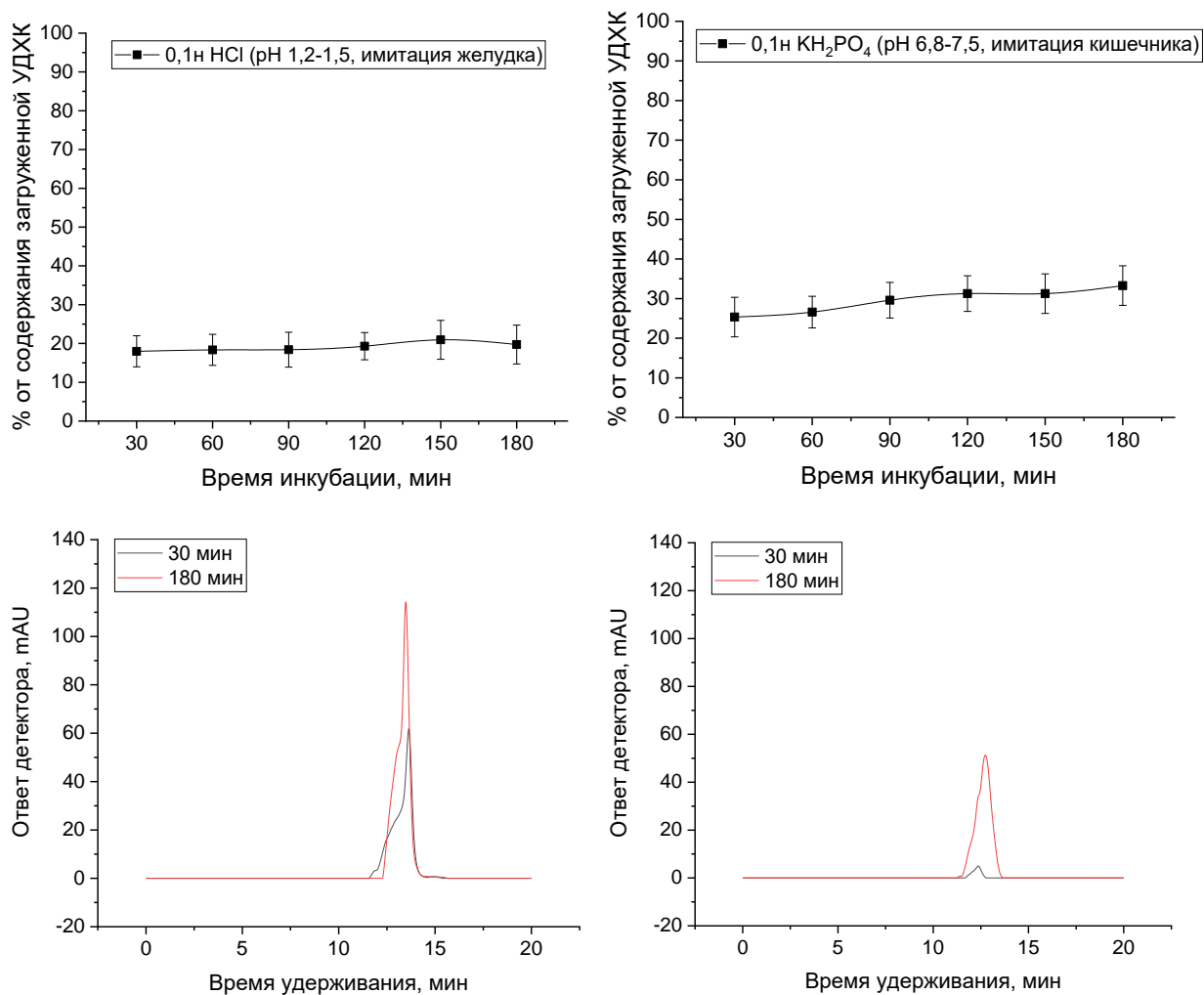


Рисунок 8 – Динамика pH-зависимого высвобождения УДХК из таблетированной формы на основе низкометоксилированной ПГК. Под каждым графиком изображены хроматограммы, соответствующие первой и последней временной точке инкубации в имитированных средах ЖКТ

### 3.1.3. Выход УДХК из низкометоксилированной амидированной ПГК

Таблетка с амидированной НМ ПГК претерпевает полное разрушение сразу же после помещения в среду, симулирующую желудок, и высвобождает около 70% загруженной УДХК (рисунок 9). Неполное высвобождение при разрушении таблетированной формы препарата может быть обусловлено тем, что молекулы ПГК все-таки связывают и удерживают какую-то часть гепатопротектора. Такое поведение может быть связано с тем, что амидные группы этого пектина в среде, богатой ионами водорода, приобретают положительный заряд, и молекулы отталкиваются прежде, чем смогут образовать гель с ионами кальция.

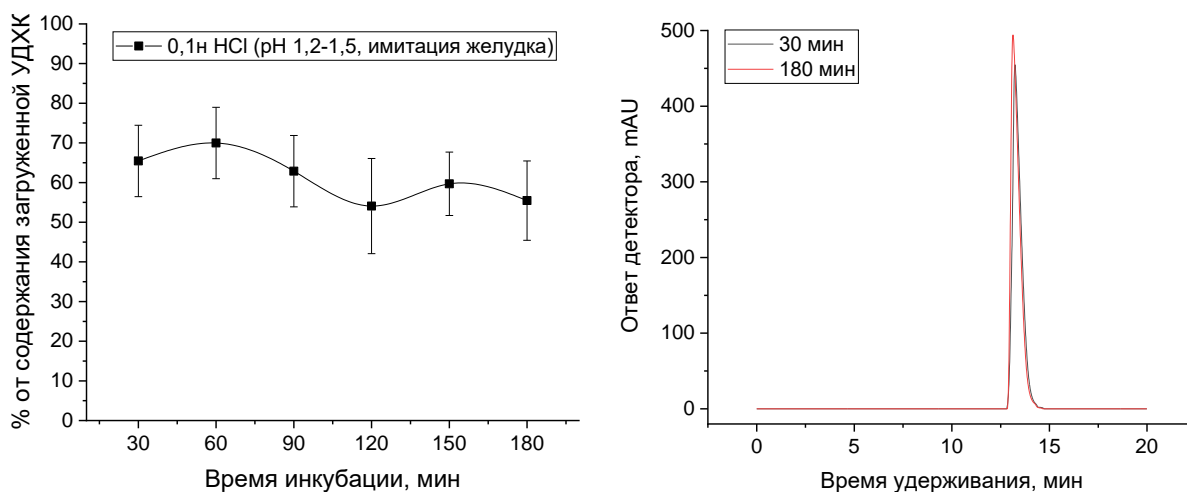


Рисунок 9 – Динамика pH-зависимого высвобождения УДХК из таблетированной формы на основе низкометоксилированной амидированной ПГК. Под каждым графиком изображены хроматограммы, соответствующие первой и последней временной точке инкубации в имитированных средах ЖКТ

Таким образом, из таблетированных форм на основе ПГК различных типов наиболее эффективно с задачей доставки УДХК в тонкий кишечник справляется высокометоксилированная ПГК: таблетка относительно мало высвобождает УДХК в имитации желудка, и достаточно эффективно

высвобождает ее в имитации кишечника. Двадцатипроцентная потеря УДХК, связанная с разрушением поверхностных слоев таблетки сразу после попадания в «желудок», возможно, может быть минимизирована изменением распределения УДХК в таблетке (так, чтобы на поверхности был только слой пектина) – это будет исследовано в будущем.

Стоит отметить, что форма на основе низкометоксилированного неамидированного пектина мало высвобождает УДХК как в «желудке», так и в «кишечнике», что говорит о перспективах ее использования для доставки веществ в толстый кишечник.

### **3.2. Выявление структурных факторов, определяющих различия в механизмах агрегации пектинов различных структурных типов**

Для исследования роли структурных особенностей пектиновых полисахаридов в специфике формирования ими надмолекулярных структур методами светорассеяния и атомно-силовой микроскопии было изучено три типа пектинов: ПГК и два варианта РГ-I – картофельный (кРГ-I) и льняной (лРГ-I). Моносахаридный состав представлен в таблице 2. ПГК представляет собой линейный полимер галактуроновой кислоты, в составе также выявляются минимальное содержание других моносахаридов (~6%, таблица 2). Остов картофельного РГ-I содержит фрагменты ПГК – об этом говорит отношение мономеров, формирующих остов, GalA/Rha, равное 9,8. Также кРГ-I имеет боковые галактановые цепи. У льняного РГ-I соотношение GalA/Rha чуть больше единицы, то есть остов этого полисахарида не содержит продолжительных включений галактуроновой кислоты. Общее содержание галактозы в составе лРГ-I больше, чем в составе кРГ-I, но из-за увеличенного содержания рамнозы, которая как раз присоединяет боковые цепи, соотношение Gal/Rha у льняного РГ-I лишь немного больше, чем у картофельного (таблица 2). Тем не менее, большее общее содержание

галактозы предполагает больше возможностей для формирования между цепями водородных связей.

Таблица 2 – Моносахаридный состав исследуемых полисахаридов

Образец	Содержание моносахаридов, моль %						GalA/Rha	Gal/Rha
	GalA	Rha	Ara	Xyl	Gal	другие остатки		
ПГК	94,0	1,0	0,2	1,0	1,0	2,8	94,0	1,0
кРГ-I	61,0	6,2	2,5	0,5	23,1	6,7	9,8	3,7
лРГ-I	17,2	10,1	2,4	0,0	48,9	21,4	1,7	4,8

### 3.2.1. Особенности агрегации полигалактуроновой кислоты

Для определения того, как степень ионизации карбоксильных групп влияет на способность полигалактуроновой кислоты формировать надмолекулярные структуры, было проанализировано гидродинамическое поведение ее растворов при разном уровне кислотности среды (рисунок 10).

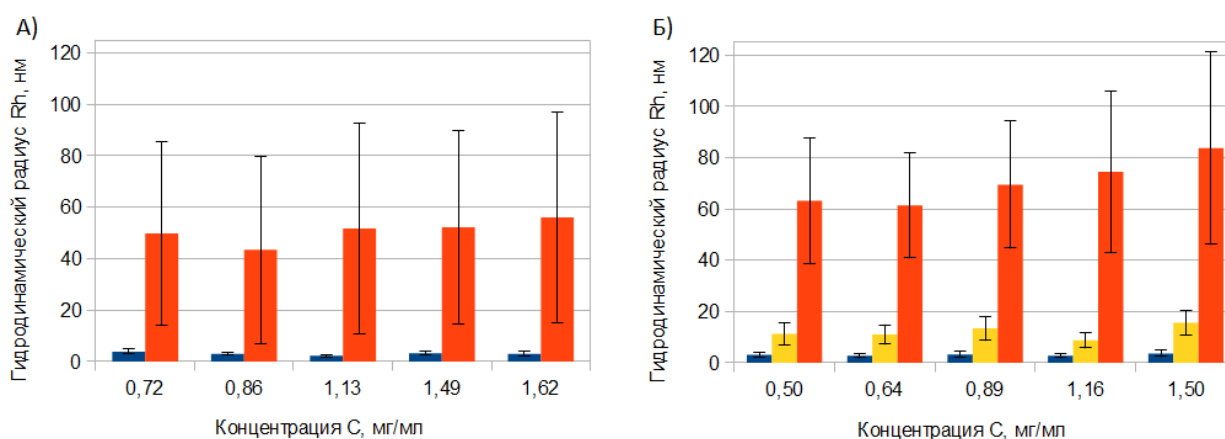


Рисунок 10 – Гидродинамические радиусы ПГК по данным динамического светорассеяния под углом  $140^\circ$  в зависимости от концентрации в растворах с  $pH = 6$  (А) и  $pH = 3,6$  (Б)

В исходных растворах (рисунок 10А) выявляются два типа частиц – малые, размеры которых относительно постоянны в исследованном диапазоне концентраций, и большие, размер которых растет с увеличением концентрации. Это может свидетельствовать о том, что ПГК имеет склонность к самопроизвольной агрегации даже в неподкисленных растворах.

После подкисления (рисунок 10Б) большие частицы увеличиваются в размерах, и появляются частицы еще одного размерного типа, при этом размер больших частиц увеличивается с ростом концентрации быстрее, чем в исходных растворах. То есть снижение степени ионизации карбоксильных групп и уменьшение заряда молекул способствует их сближению и возникновению дополнительных возможностей для агрегации.

На топографических изображениях ПГК, полученных методом атомно-силовой микроскопии, всегда выявляются две разновидности объектов: длинные линейные, что можно ожидать от неразветвленного полисахарида, и мелкие округлые, которые могут быть агрегатами олигомеров (рисунок 11).



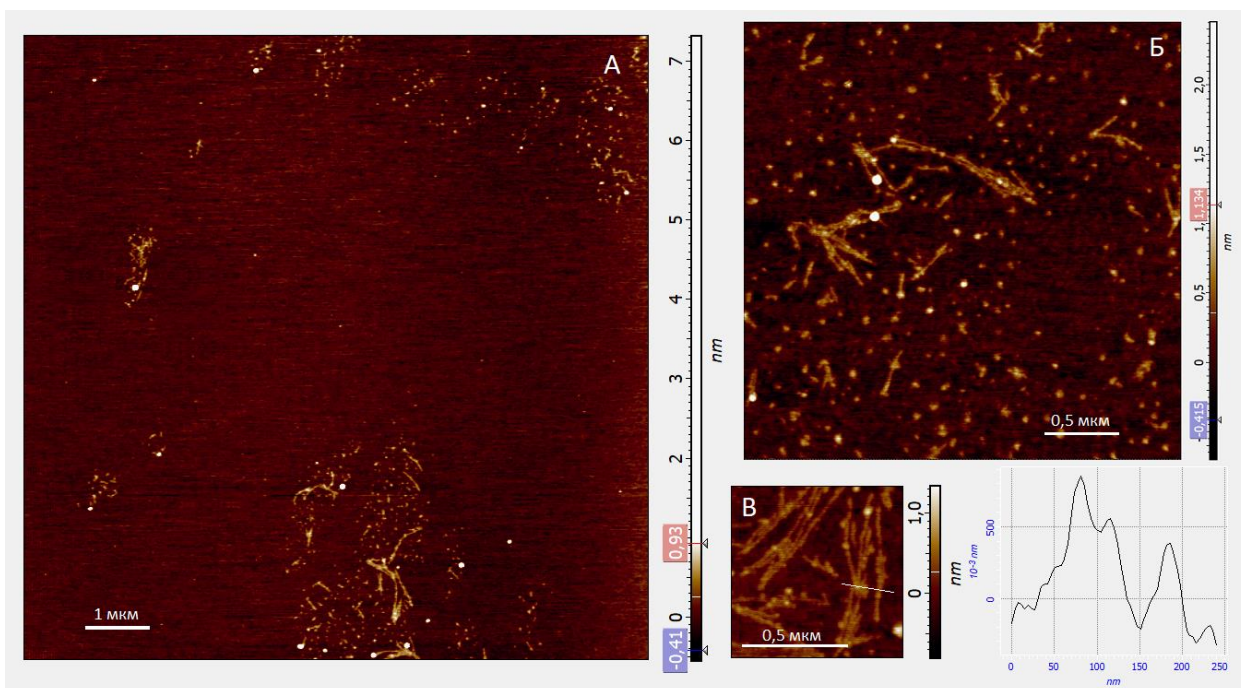


Рисунок 11 – Топографические изображения полигалактуроновой кислоты. А – скан 10x10 мкм, Б – 3x3 мкм, В – 0,8x0,8 мкм. Высотный профиль относится к срезу объектов на изображении В

Слюды растворы ПГК покрывают неравномерно, концентрируясь в отдельных областях (рисунок 11А), что может служить подтверждением их высокой склонности к взаимодействию. Длинные объекты часто находятся в кластерах, иногда лежат друг на друге. Их высотные профили вдоль длинной стороны в большинстве случаев неравномерные, присутствуют локальные короткие возвышения, как если бы мелкие округлые объекты были ассоциированы с остовом длинных или лежали на них, либо сами длинные объекты являлись ассоциатом коротких, а возвышения представляли собой места их связки.

Длинные объекты в основном прямые или слегка изогнутые, похожие на жесткие стержни, со средней длиной 271,8 нм, средней шириной 41,8 нм и средней высотой 0,64 нм. Округлые объекты имеют среднюю длину 29,2 нм, ширину 27,6 нм и высоту 0,62 нм.

### 3.2.2. Особенности агрегации картофельного рамногалактуронана I

По результатам динамического светорассеяния растворов картофельного рамногалактуронана I в диапазоне концентраций от 0,14 до 1,43 мг/мл, во всех растворах независимо от концентрации были обнаружены частицы трех типов: большие (средний гидродинамический радиус  $R_h = 207$  нм), средние (средний  $R_h = 45$  нм) и малые (средний  $R_h = 7$  нм). При этом с увеличением концентрации не наблюдалось ни последовательного увеличения размеров частиц, ни перехода одних частиц в другие (об этом свидетельствовало бы одновременное увеличение вклада в рассеянную интенсивность одного типа частиц и уменьшение вклада другого типа): система частиц ведет себя достаточно стабильно даже при десятикратном изменении концентрации.

Основной вклад в рассеянную интенсивность для всех концентраций и на всех углах рассеяния дает большая частица, для ее характеристики с помощью статического светорассеяния общая рассеянная интенсивность была пересчитана с учетом ее вкладов, и была построена диаграмма Зимма (рисунок 12).

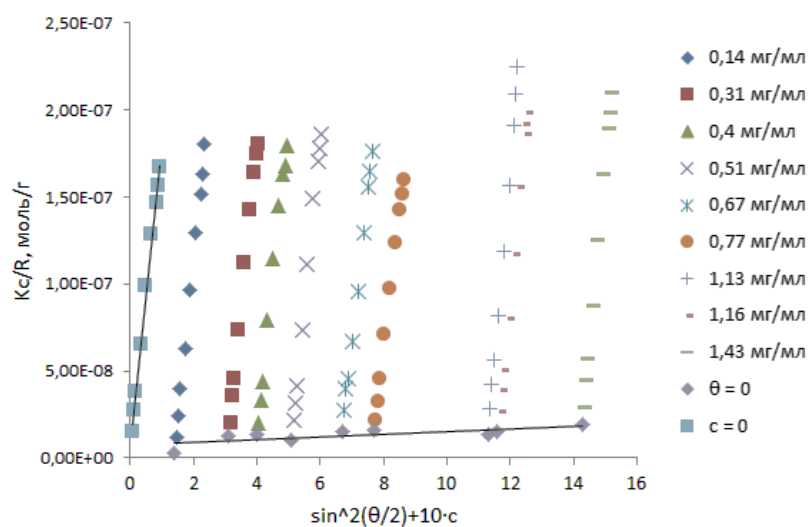


Рисунок 12 – Диаграмма Зимма для большой частицы картофельного рамногалактуронана I

С помощью экстраполяции к нулевому углу были определены молекулярная масса  $M_w = 1,36 \cdot 10^8$  г/моль и второй вириальный коэффициент  $A_2 = 3,9 \cdot 10^{-6}$  моль·мл/г<sup>2</sup>.

Колоссальное значение молекулярной массы подтверждает предположение о том, что данная частица является агрегатом молекул. Положительное значение второго вириального коэффициента говорит об отсутствии склонности агрегатов к взаимодействию и дальнейшей агрегации. По экстраполяции к нулевой концентрации был определен радиус инерции этого агрегата  $R_g = 329$  нм, что позволило рассчитать его форм-фактор  $\rho = \frac{R_g}{R_h} = 1,6$ . Он близок по значению к форм-фактору полимерного клубка и попадает в диапазон значений форм-фактора эллипсоида.

Фильтрация раствора кРГ-I через фильтры Anotop с размером пор 20 нм помогла избавиться от средних и больших частиц (рисунок 13Б), средний гидродинамический радиус оставшихся частиц – 7,8 нм.

При этом даже после концентрирования раствора до сопоставимых с предыдущим экспериментом концентраций большие агрегаты, похожие на выявленные ранее, не формируются. Это может говорить о том, что частицы не имеют способности к самопроизвольной ассоциации в водном растворе, а наблюдаемые агрегаты формируются непосредственно в процессе биосинтеза и транспорта данного полисахарида в растении.

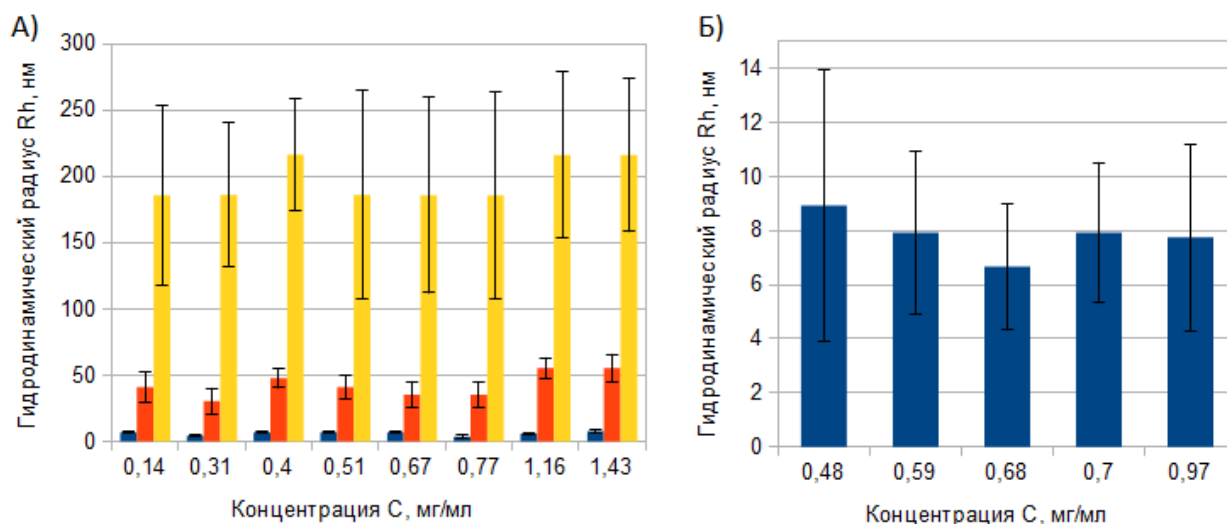


Рисунок 13 – Гидродинамические радиусы κРГ-I (по данным динамического светорассеяния под углом  $140^{\circ}$ ) в зависимости от концентрации в растворах, пропущенных через фильтры с размером пор А) 220 нм; Б) 20 нм

Для меньшей частицы аналогично предыдущему случаю была построена диаграмма Зимма, и были рассчитаны значения  $M_w = 4,34 \cdot 10^4$  г/моль,  $A_2 = 4,85 \cdot 10^{-3}$  моль·мл/г<sup>2</sup> и  $R_g = 29,9$  нм. Форм-фактор равен 3,8 и попадает в диапазон значений для эллипсоида, приближаясь к верхней границе диапазона. Второй вириальный коэффициент положителен, что опять же говорит об отсутствии склонности частиц к взаимодействию.

Методом АСМ были получены изображения картофельного РГ-I, высушенного на слюде (рисунок 14). На сканах образцов, растворы которых были пропущены через фильтры с размером пор 220 нм, объекты имеют среднюю длину 48,8 нм, ширину 31,5 нм и высоту 0,7 нм. На сканах образцов, растворы которых были пропущены через фильтры с размером пор 20 нм, объекты имеют среднюю длину 33,8 нм, ширину 22,5 нм и высоту 0,56 нм.

Картофельный РГ-I покрывает слюду равномерно, не проявляя никакой склонности стягиваться в отдельные области при высыхании, что неудивительно, учитывая результаты светорассеяния. На АСМ-изображениях объекты представляются компактными округлыми и эллиптическими. В

пределах некоторых объектов картофельного РГ-I выявляются локальные возвышения, говорящие о перекрытии молекул, что может являться артефактом высушивания или местом взаимодействия молекул, формирующих агрегаты.

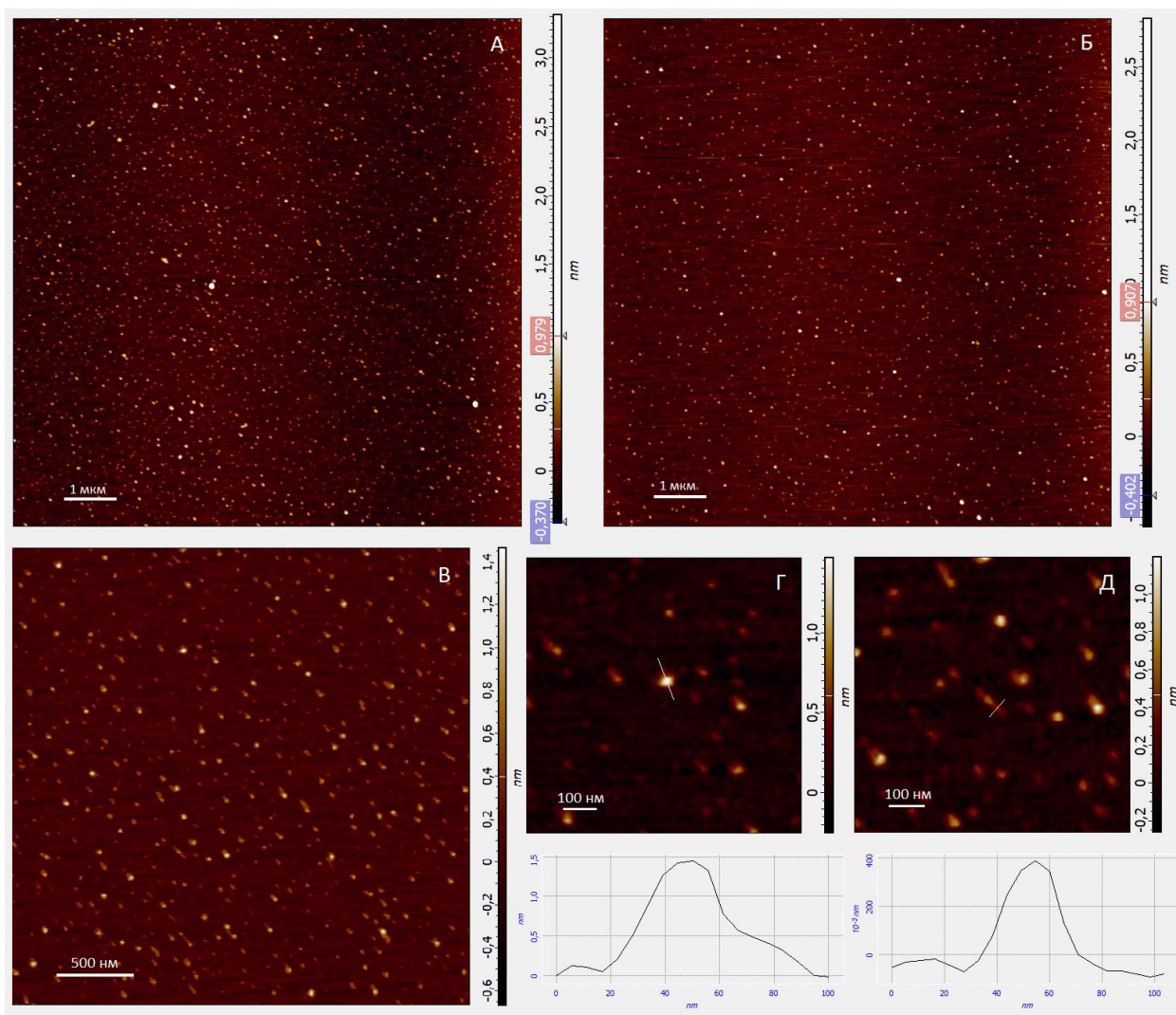


Рисунок 14 – Топографические изображения картофельного РГ-I. На изображении А представлен образец, раствор которого был пропущен через фильтры с размером пор 220 нм, на остальных изображениях – через фильтры с размером пор 20 нм. Сканы А и Б – 10x10 мкм, В – 3x3 мкм, В и Г – 0,8x0,8 мкм. Под изображениями Г и Д представлены высотные профили отмеченных объектов

### 3.2.3. Особенности агрегации льняного рамногалактуронана I

Динамическое рассеяние света раствором льняного рамногалактуронана I, пропущенного через фильтры с размером пор 220 нм, выявляет многомодальную систему частиц, размер которых превышает размеры пор фильтра и сильно изменяется с увеличением концентрации (рисунок 15А). Уже этот факт отражает различия в агрегации картофельного и льняного рамногалактуронанов I, предполагая способность льняного РГ-I к самопроизвольной ассоциации.

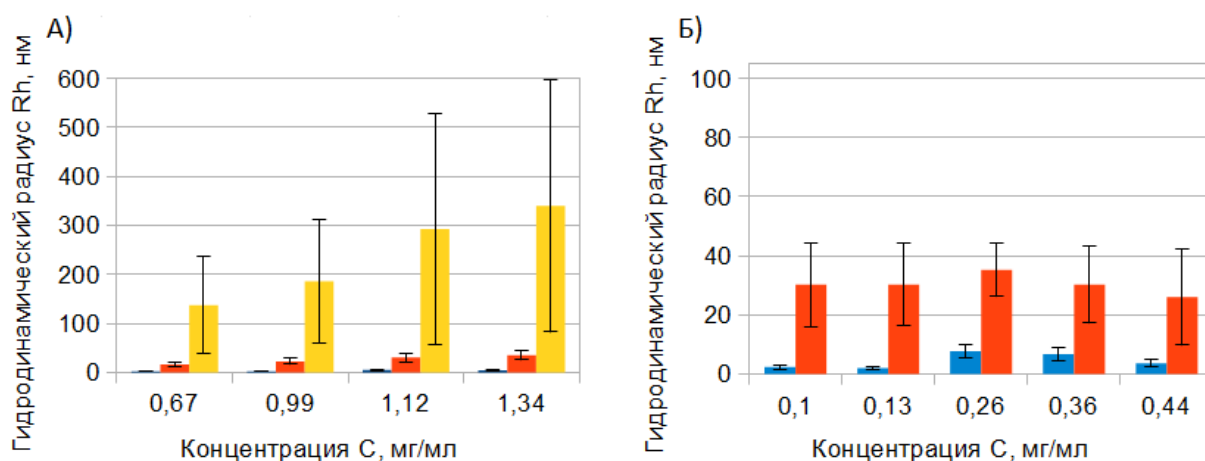


Рисунок 15 – Гидродинамические радиусы лРГ-I (по данным динамического светорассеяния под углом  $140^\circ$ ) в зависимости от концентрации в растворах, пропущенных через фильтры с размером пор А) 220 нм; Б) 20 нм

Проводить эксперименты по статике с такой системой частиц проблематично. Поэтому образец также был профильтрован через Anotop и исследован методом статического светорассеяния. В пределах исследуемых концентраций состав раствора не изменялся: в нем присутствовали частицы со средним  $R_h = 32$  нм и частицы со средним  $R_h = 5$  нм (рисунок 15Б). При этом почти весь вклад в интенсивность давала большая из двух оставшихся после фильтрации частиц. Для нее по данным зависимости интенсивности от угла рассеяния и концентрации раствора была построена диаграмма Зимма.

Аналогично предыдущему случаю были рассчитаны значения  $M_w = 4,25 \cdot 10^5$  г/моль,  $A_2 = -2,84 \cdot 10^{-4}$  моль·мл/г<sup>2</sup> и  $R_g = 20,4$  нм. Форм-фактор, таким образом, равен 1,6, то есть частица представляется полимерным клубком эллипсоидной формы. Второй вириальный коэффициент, в отличие от случая кРГ-I, отрицателен, что говорит о склонности частиц к взаимодействию.

Интересно отметить тот факт, что в фильтрованном через Anotop растворе лРГ-I, в отличие от кРГ-I, присутствуют два типа частиц, размер большей из которых превышает размер пор фильтра; это еще раз говорит о том, что частицы, прошедшие через фильтр, способны спонтанно ассоциировать после механического разрушения изначально сформированных в клетке агрегатов.

На полученных методом АСМ изображениях образцов, пропущенных через фильтры с размером пор 220 нм, действительно выявляется класс объектов с размерами, значительно превышающими размеры большинства остальных, полученных при пропускании через фильтр с меньшим размером пор (рисунок 16А).

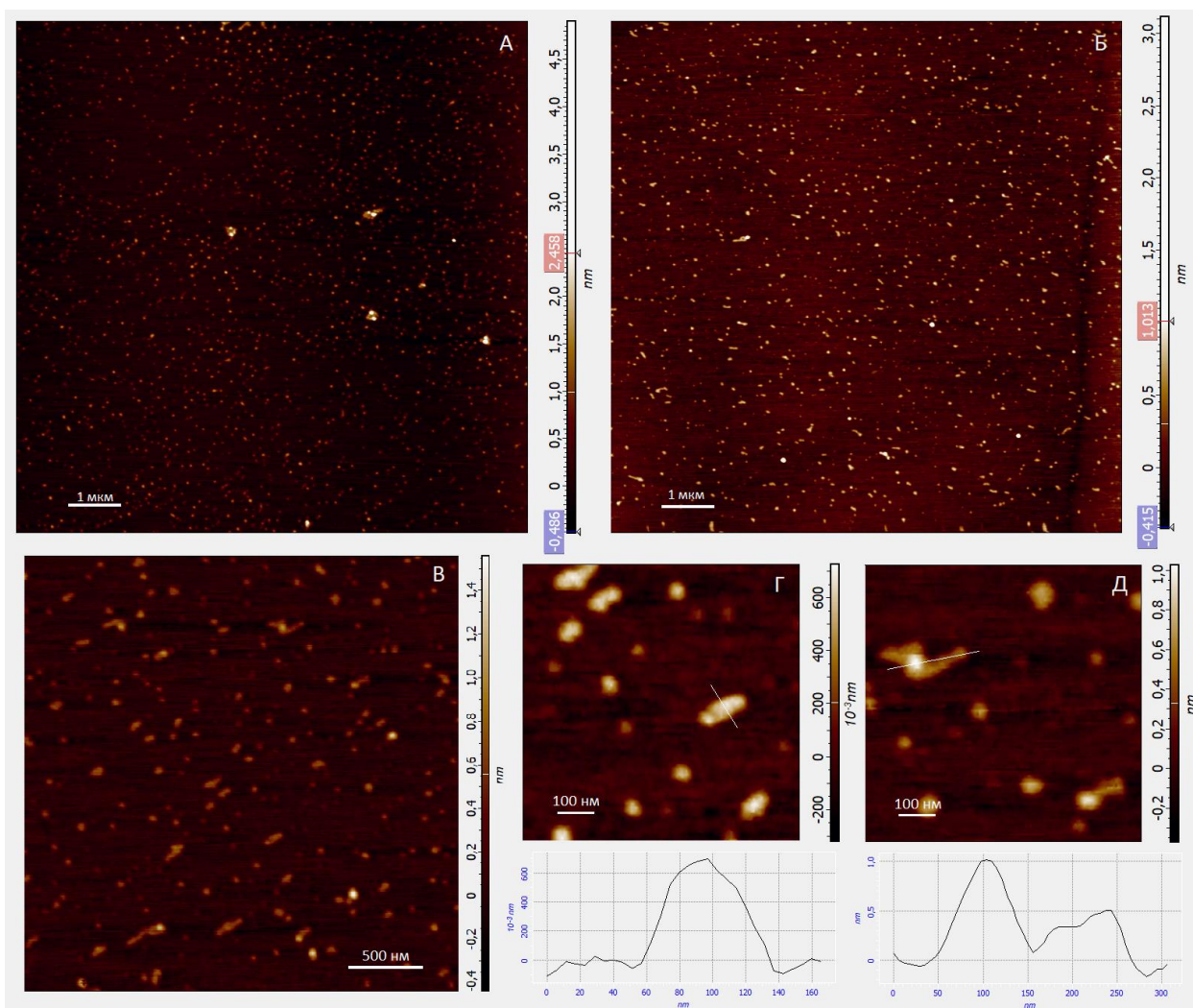


Рисунок 16 – Топографические изображения льняного РГ-I. На изображении А представлен образец, раствор которого был пропущен через фильтры с размером пор 220 нм, на остальных изображениях – через фильтры с размером пор 20 нм. Изображения А и Б – 10x10 мкм, В – 3x3 мкм, Г и Д – 0,8x0,8 мкм. Под изображениями Г и Д представлены высотные профили отмеченных объектов

Мелкие объекты представлены компактными округлыми и эллиптическими образованиями, иногда имеющими «хвосты». Средняя длина таких объектов – 56,3 нм, ширина – 33 нм и высота – 0,75 нм. Некоторые объекты, как и в случае картофельного РГ-I, имеют локальные возвышения, примерно в два раза превышающие высоту остальных частей объекта (рисунок 16Д). Такие возвышения, опять же, могут быть простым наложением молекул друг на друга при высыхании, либо, как предполагают



авторы в работе [7] для случая льняного РГ-I, они могут представлять собой места взаимодействующих галактановых цепей, за счет которых формируются агрегаты.

На сканах образцов, пропущенных через фильтры с размером пор 20 нм, таких крупных объектов, как в предыдущем случае, не выявляется. Объекты похожи по форме на мелкие объекты с предыдущих сканов, имеют среднюю длину 53 нм, ширину 29,2 нм и высоту 0,62 нм.

Льняной РГ-I также высыхает на слюде относительно неравномерно, однако, в отличие от ПГК, на сканах не выявляются настолько большие пустые области, и границы между пустыми и занятыми областями нечеткие (рисунок 17А).

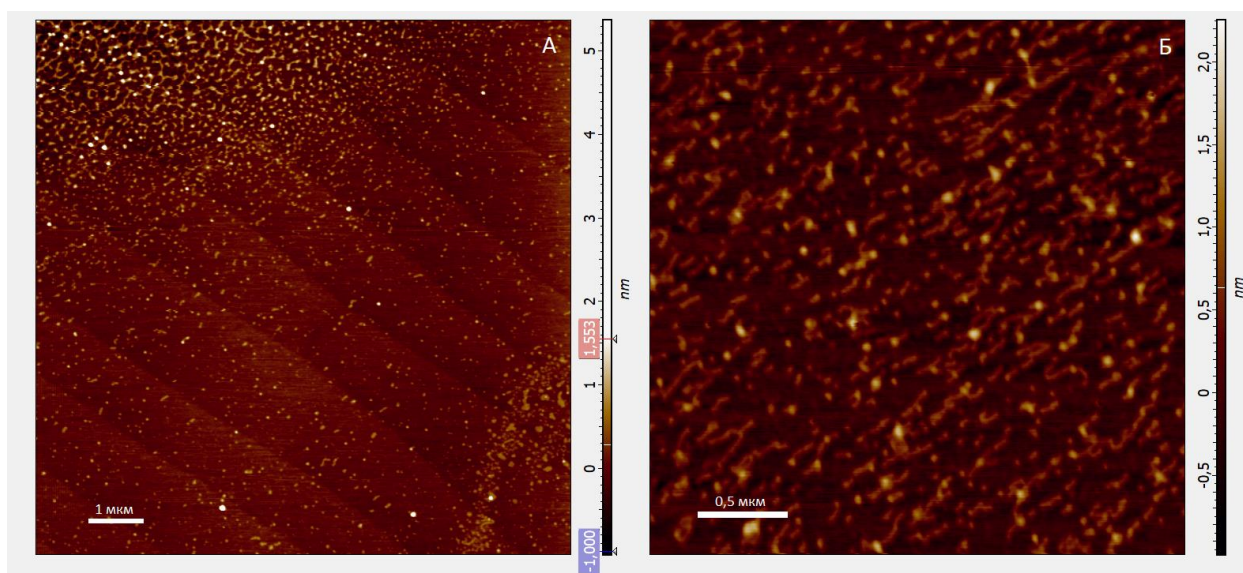


Рисунок 17 – Топографические изображения сетеподобных структур льняного РГ-I. А – скан 10x10 мкм, Б – 3x3 мкм

Присутствуют области с высокой концентрацией, где объекты выглядят так, будто пытаются образовать сеть (рисунок 17Б). В таких областях объекты скорее разветвленные линейные, чем компактные сферические, что может быть следствием того, что в высококонцентрированном растворе молекулы взаимодействуют

галактановыми цепями с множественными соседями и разворачиваются, чтобы создать с ними связи.

Тот факт, что картофельный РГ-I, в отличие от льняного РГ-I, не проявляет склонности к самопроизвольной агрегации в растворах, наталкивает на мысль о том, что механизмы агрегации у этих полисахаридов должны различаться. Известно, что при ионотропном гелеобразовании низкометоксилированной ПГК карбоксильные группы молекул химически связываются через бивалентные катионы, чаще  $\text{Ca}^{2+}$ , создавая сеть не растворимого в воде геля. Такое связывание фрагментов ПГК в остове молекул картофельного РГ-I объяснило бы отсутствие их склонности к спонтанной агрегации в растворах: возможно, из растения эти полисахариды выделяются в виде уже сшитых агрегатов, в которых карбоксильные группы ПГК максимально связаны и не могут больше участвовать в присоединении новых молекул, а образование водородных связей галактановыми цепями затруднено из-за их расположения на остове, длины или количества.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате работы на основе полигалактуроновой кислоты трех разновидностей были созданы таблетированные формы для доставки гепатопротектора УДХК в кишечник, и была изучена динамика рН-зависимого высвобождения из них УДХК. Показано, что использование пектиновых полисахаридов даже на базе одного остова с варьирующим характером и степенью модификации позволяет создать системы, имеющие различную эффективность доставки лекарственного вещества в целевые отделы кишечника. Обнаружено, что лучше для решения поставленной в работе задачи подходит высокометоксилированная ПГК.

С целью расширить возможности применения более широкого структурного разнообразия пектиновых полисахаридов в разработке систем доставки лекарств методами светорассеяния и атомно-силовой микроскопии были изучены особенности агрегации пектинов трех структурных типов: полигалактуроновой кислоты, льняного рамногалактуронана I без фрагментов ПГК в остове и длинными боковыми галактановыми цепями и картофельного рамногалактуронана I с фрагментами ПГК в остове и боковыми галактановыми цепями.

Обнаружено, что гидродинамическое поведение рамногалактуронанов I, имеющих различное содержание ПГК в остове и различия в содержании галактозы, формирующей боковые цепи, значительно различается: картофельный РГ-I, в отличие от льняного, не проявляет склонности к взаимодействию молекул и самопроизвольной агрегации. Выдвинуто предположение о том, что такое поведение может быть связано с полным связыванием карбоксильных групп ПГК через бивалентные катионы еще в растении и конформационно удаленном друг от друга расположением, либо малой длиной галактановых цепей.

## ВЫВОДЫ

1. Были разработаны и исследованы системы доставки УДХК на основе полигалактуроновой кислоты. Установлено, что:

а) таблетированные формы на основе высокометоксилированной ПГК высвобождают незначительное количество УДХК при имитации среды желудка (20%) и постепенно высвобождают ее при имитации среды кишечника (40%);

б) таблетированные формы на основе низкометоксилированной ПГК высвобождают незначительное количество УДХК как при имитации желудочной среды (20%), так и при имитации среды кишечника (13%);

в) таблетированные формы на основе амидированной низкометоксилированной ПГК высвобождают УДХК сразу после попадания в среду с рН, имитирующим условия желудка;

2. Охарактеризованы особенности агрегации пектиновых полисахаридов различных типов. Установлено, что

а) молекулы ПГК способны к самопроизвольной агрегации в водных растворах, причем подкисление и снятие заряда с карбоксильных групп приводит к дополнительной агрегации;

б) картофельный РГ-I, содержащий в структуре остова фрагменты ПГК и укороченную среднюю длину галактановых боковых цепей, представлен отдельными молекулами и их агрегатами, при этом ни уже сформированные агрегаты, ни молекулы не имеют склонности к взаимодействию и самопроизвольной агрегации в растворах;

в) льняной РГ-I, в структуре остова которого отсутствуют фрагменты ПГК, а средняя длина боковых галактановых цепей больше, чем у картофельного РГ-I, также представлен отдельными молекулами и их агрегатами, но, в отличие от картофельного, проявляет склонность к взаимодействию и самопроизвольной агрегации в растворах, а при высыхании на слюде иногда формирует сетеподобные структуры, не выявленные для картофельного РГ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Процессы гелеобразования и реологические свойства умеренно-концентрированных водных растворов цитрусового пектина в присутствии ионов поливалентных металлов / М. Ю. Мухамеджанова, А. В. Филатова, Д. Т. Джурабаев, А. С. Тураев // Химия растительного сырья. – 2012. – № 1. – С. 51-60.
2. Axelos M. A. V. The chemistry of low-methoxyl pectin gelation / M. A. V. Axelos, J. F. Thibault // The chemistry and technology of pectin. – 1991. – № 6. – P. 109-108.
3. Reitsma, J. C. E. Properties of amidated pectins. I. Preparation and characterization of amidated pectins and amidated pectic acids / J. C. E Reitsma, J. F. Thibault, W. Pilnik // Food Hydrocolloids. – 1986. – Vol. 1, № 2. – P. 121-127.
4. May C. D. Factors affecting pectin gelation / C. D. May, G. Stainsby // Gums and stabilisers for the food industry. – 1986. – № 3. – P. 11-16.
5. Physicochemical properties of pectins from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) / N. Sengkhampan, L. M. Sagis, R. De Vries [et al.] // Food Hydrocolloids. – 2010. – Vol. 24, № 12. – P. 35-41.
6. Physicochemical properties of complex rhamnogalacturonan I from gelatinous cell walls of flax fibers / P. V. Mikshina, B. Z. Idiyatullin, A. A. Petrova [et al.] // Carbohydrate polymers. – 2015. – № 117. – P. 853-861.
7. AFM analysis reveals polymorphism of purified flax rhamnogalacturonans I of distinct functional types / A. A. Petrova, L. V. Kozlova, I. Z. Gaifullina [et al.] // Carbohydrate polymers. – 2019. – № 216. – P. 238-246.
8. Gelation of rhamnogalacturonan I is based on galactan side chain interaction and does not involve chemical modifications / P. V. Mikshina, O. N. Makshakova, A. A. Petrova [et al.] // Carbohydrate polymers. – 2017. – № 171. – P. 143-151.
9. Tissue-specific rhamnogalacturonan I forms the gel with hyperelastic properties / P. V. Mikshina, A. A. Petrova, D. A. Faizullin [et al.] // Biochemistry (Moscow). – 2015. – № 80. – P. 915-924.

10. Morris, E. R. Ordered conformation of xanthan in solutions and “weak gels”: Single helix, double helix—or both? / E. R. Morris // *Food Hydrocolloids*. – 2019. – № 86. – P. 18-25.
11. Muller, G. Charge-induced order-disorder transition in an ionic polysaccharide derived from schizophyllan / G. Muller // *Carbohydrate polymers*. – 1986. – Vol. 6, № 3. – P. 177-191.
12. Wilkie, J. S. Carl Nägeli and the fine structure of living matter / J. S. Wilkie // *Nature*. – 1961. – № 190. – P. 1145-1150.
13. Tsai, C. S. *Biomacromolecules: Introduction to structure, function and informatics* / C. S. Tsai. – New Jersey : John Wiley & Sons, 2007. – 740 p.
14. Rees, D. A. Secondary and tertiary structure of polysaccharides in solutions and gels / D. A. Rees, E. J. Welsh // *Angewandte Chemie International Edition in English*. – 1977. – Vol. 16, № 4. – P. 214-224.
15. Eggleston, G. *Polysaccharides: Molecules, clusters, networks, and interactions* / G. Eggleston, J. P. Doyle. // *ACS Symposium Series*. – 2006. – Vol. 935. – P. 19-34.
16. Lang, P. Investigations of the architecture of tamarind seed polysaccharide in aqueous solution by different scattering techniques / P. Lang, K. Kajiwara // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. – 1993. Vol. 4, № 5. – P. 517-528.
17. Grimm, A. Solution properties of  $\beta$ -D-(1, 3)(1, 4)-glucan isolated from beer / A. Grimm, E. Krüger, and W. Burchard // *Carbohydrate Polymers*. – 1995. – Vol. 27, № 3. – P. 205-214.
18. McIntire, T. M. Observations of the (1 $\rightarrow$  3)- $\beta$ -d-glucan linear triple helix to macrocycle interconversion using noncontact atomic force microscopy / T. M. McIntire, D. A. Brant // *Journal of the American Chemical Society*. – 1998. – Vol. 120, № 28. – P. 6909-6919.
19. Wheat arabinoxylans: exploiting variation in amount and composition to

- develop enhanced varieties / L. Saulnier, P. E. Sado, G. Branlard [et al.] // *Journal of Cereal Science*. – 2007. Vol. 46, № 3. – P. 261-281.
20. Solution conformation of konjac glucomannan single helix / C. Wang, Y. Zhang, H. X. Huang [et al.] // *Advanced Materials Research*. – 2011. – Vol. 197. – P. 96-104.
21. Mobility-resolved  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy of primary plant cell walls / T. J. Foster, S. Ablett, M. C. McCann, M. J. Gidley // *Biopolymers*. – 1996. Vol. 39, № 1. – P. 51-66.
22. Characterization of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-galactan / A. Fukushima, F. Tanaka, J. I. Azuma, T. Iwata // *Wood research: bulletin of the Wood Research Institute Kyoto University*. – 1997. – Vol. 84. – P. 37-38.
23. Gidley, M. J. Physico-chemistry of (1, 3)- $\beta$ -glucans / M. J. Gidley, K. Nishinari // *Chemistry, biochemistry, and biology of 1-3 beta glucans and related polysaccharides*. – 2009. – P. 47-118.
24. Parallel-up structure evidences the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose / M. Koyama, W. Helbert, T. Imai [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1997. Vol. 94, № 17. – P. 9091-9095.
25. Krässig, H. A. Cellulose: structure, accessibility and reactivity / H. A. Krässig. – Philadelphia : Gordon and Breach Science Publishers, 1993. – 367 p.
26. Kondo, T. The relationship between intramolecular hydrogen bonds and certain physical properties of regioselectively substituted cellulose derivatives / T. Kondo // *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. – 1997. – Vol. 35, № 4. – P. 717-723.
27. Lindman, B. On the mechanism of dissolution of cellulose / B. Lindman, G. Karlström, L. Stigsson // *Journal of molecular liquids*. – 2010. – Vol. 156, № 1. – P. 76-81.
28. Festucci-Buselli, R. A. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants / R. A. Festucci-Buselli, W. C. Otoni, C. P. Joshi // *Brazilian Journal of Plant Physiology*. – 2007. – № 19. – P. 1-13.

29. Hayashi, T. Pea xyloglucan and cellulose: VI. Xyloglucan-cellulose interactions in vitro and in vivo / T. Hayashi, M. P. F. Marsden, and D. P. Delmer // *Plant Physiology*. – 1987. – Vol. 83, № 2. – P. 384-389.
30. Fractionation of xyloglucan fragments and their interaction with cellulose / J. P. Vincken, A. de Keizer, G. Beldman, A. G. J. Voragen // *Plant Physiology*. – 1995. – Vol. 108, № 4. – P. 1579-1585.
31. Hayashi, T. Characterization of the adsorption of xyloglucan to cellulose / T. Hayashi, K. Ogawa, Y. Mitsuishi // *Plant and Cell Physiology*. – 1994. – Vol. 35, № 8. – P. 1199-1205.
32. Lima, D. U. Xyloglucan–cellulose interaction depends on the sidechains and molecular weight of xyloglucan / D. U. Lima, W. Loh, M. S. Buckeridge // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2004. – Vol. 42, № 5. – P. 389-394.
33. Hanus, J. The xyloglucan–cellulose assembly at the atomic scale / J. Hanus, K. Mazeau // *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*. – 2006. – Vol. 82, № 1. – P. 59-73.
34. Assessment of in vitro binding of isolated pectic domains to cellulose by adsorption isotherms, electron microscopy, and X-ray diffraction methods / A. Zykwincka, C. Gaillard, A. Buléon [et al.] // *Biomacromolecules*. – 2007. – Vol. 8, № 1. – P. 223-232.
35. Chemistry and uses of pectin—A review / B. R. Thakur, R. K. Singh, A. K. Handa, M. A. Rao // *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*. – 1997. – Vol. 37, №1. – P. 47-73.
36. Sriamornsak, P. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: A review / P. Sriamornsak // *Silpakorn University International Journal*. – 2003. – Vol. 3, №1(2). – P. 206-228.
37. Оводов, Ю. С. Современные представления о пектиновых веществах / Ю. С. Оводов // *Биоорганическая химия*. – 2009. – Т. 35, № 3. – С. 293-310.
38. Kobayashi, M. Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls / M. Kobayashi, T. Matoh, J. I. Azuma // *Plant Physiology*. – 1996. – Vol. 110, №3. – P. 1017-1020.



39. The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer / T. Ishii, T. Matsunaga, P. Pellerin [et al.] // *Journal of Biological chemistry*. – 1999. – Vol. 274, № 19. – P. 13098-13104.
40. Gawkowska, D. Structure-related gelling of pectins and linking with other natural compounds: A review / D. Gawkowska, J. Cybulska, A. Zdunek // *Polymers*. – 2018. – Vol. 10, №7. – P. 762.
41. Figueroa-Espinoza, M. C. Effect of lysine, tyrosine, cysteine, and glutathione on the oxidative cross-linking of feruloylated arabinoxylans by a fungal laccase / M. C. Figueroa-Espinoza, M. H. Morel, X. Rouau // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1998. – Vol. 46, № 7. – P. 2583-2589.
42. Geissmann, T. On the composition of the water soluble wheat flour pentosans and their oxidative gelation. / T. Geissmann, H. Neukom // *Lebensmittel-Wissenschaft+Technologie. Food science+technology*. – 1973. – Vol. 6, № 2. – P. 59-62.
43. Thermal characterisation of oxidatively cross-linked American corn bran hemicellulose / D. M. Georget, A. Ng, A. C. Smith, K. W. Waldron // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 1999. – Vol. 79, № 3. – P. 481-483.
44. Hosney, R. C. A mechanism for the oxidative gelation of wheat flour water-soluble pentosans / R. C. Hosney, J. M. Faubion // *Cereal Chem*. – 1981. – Vol. 58, № 5. – P. 421-424.
45. Izydorczyk, M. S. Oxidative gelation studies of water-soluble pentosans from wheat / M. S. Izydorczyk, C. G. Biliaderis, W. Bushuk // *Journal of Cereal Science*. – 1990. – Vol. 11, № 2. – P. 153-169.
46. Ng, A. Oxidative cross-linking of corn bran hemicellulose: formation of ferulic acid dehydrodimers / A. Ng, R. N. Greenshields, K. W. Waldron // *Carbohydrate Research*. – 1997. – Vol. 303, № 4. – P. 459-462.
47. Izydorczyk, M. Comparison of the structure and composition of water-soluble pentosans from different wheat varieties / M. Izydorczyk, C. G. Biliaderis, W. Bushuk // *Cereal Chem*. – 1991. – Vol. 68, № 2. – P. 139-144.
48. Izydorczyk, M. Cereal arabinoxylans: advances in structure and

physicochemical properties / M. Izydorczyk, C. G. Biliaderis // Carbohydrate polymers. – 1995. – Vol. 28, № 1. – P. 33-48.

49. Rattan, O. Structure and rheological behaviour of arabinoxylans from Canadian bread wheat flours / O. Rattan, M. S. Izydorczyk, C. G. Biliaderis // LWT-Food Science and Technology. – 1994. – Vol. 27, № 6. – P. 550-555.

50. Arabinoxylan gels: Impact of the feruloylation degree on their structure and properties / E. Carvajal-Millan, V. Landillon, M. H. Morel [et al.] // Biomacromolecules. – 2005. – Vol. 6, № 1. – P. 309-317.

51. Talbott, L. D. Molecular size and separability features of pea cell wall polysaccharides: implications for models of primary wall structure / L. D. Talbott, P. M. Ray // Plant physiology. – 1992. – Vol. 98, № 1. – P. 357-368.

52. Carpita, N. C. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth / N. C. Carpita, D. M. Gibeaut // The Plant Journal. – 1993. – Vol. 3, № 1. – P. 1-30.

53. Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher plants / M. Pauly, P. Albersheim, A. Darvill, W. S. York // The Plant Journal. – 1999. – Vol. 20, № 6. – P. 629-639.

54. Popper, Z. A. Xyloglucan– pectin linkages are formed intraprotoplasmically, contribute to wall-assembly, and remain stable in the cell wall / Z. A. Popper, S. C. Fry // Planta. – 2008. – Vol. 227, № 4. – P. 781-794.

55. Gorshkova, T. Secondary cell-wall assembly in flax phloem fibres: role of galactans / T. Gorshkova, C. Morvan // Planta. – 2006. – Vol. 223, № 2. – P. 149-158.

56. Fry, S. C. Intraprotoplasmic and wall-localised formation of arabinoxylan-bound diferulates and larger ferulate coupling-products in maize cell-suspension cultures / S. C. Fry, S. C. Willis, A. E. J. Paterson // Planta. – 2000. – Vol. 211, № 5. – P. 679-692.

57. A dehydrotrimer of ferulic acid from maize bran / X. Rouau, V. Cheynier, A. Surget [et al.] // Phytochemistry. – 2003. – Vol. 63, № 8. – P. 899-903.

58. Structural identification of dehydrotriferulic and dehydrotetraferulic acids isolated from insoluble maize bran fiber / M. Bunzel, J. Ralph, P. Brüning, H. Steinhart // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2006. – Vol. 54, № 17. – P. 6409-6418.
59. Gibeaut, D. M. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides / D. M. Gibeaut, N. G. Carpita // *The FASEB Journal*. – 1994. – Vol. 8, № 12. – P. 904-915.
60. Формирование надмолекулярной структуры растительной клеточной стенки. Обзор / Т. А. Горшкова, П. В. Микшина, О. П. Гурьянов, С. Б. Чемикосова // *Биохимия*. – 2010. – Т. 75, № 2. – С. 196-213.
61. Современные представления о строении целлюлоз (обзор) / Л. А. Алешина, С. В. Глазкова, Л. А. Луговская [и др.] // *Химия растительного сырья*. – 2001. – № 1. – С. 5-36.
62. Herth, W. Plasma-membrane rosettes involved in localized wall thickening during xylem vessel formation of *Lepidium sativum* L. // W. Herth // *Planta*. – 1985. – Vol. 164, №1. – P. 12-21.
63. Fry, S. C. Intracellular feruloylation of pectic polysaccharides / S. C. Fry // *Planta*. – 1987. – Vol. 171, № 2. – P. 205-211.
64. Myton, K. E. Intraprotoplasmic feruloylation of arabinoxylans in *Festuca arundinacea* cell cultures / K. E. Myton, S. C. Fry // *Planta*. – 1994. – Vol. 193, № 3. – P. 326-330.
65. Kerr, E. M. Pre-formed xyloglucans and xylans increase in molecular weight in three distinct compartments of a maize cell-suspension culture / E. M. Kerr, S. C. Fry // *Planta*. – 2003. – Vol. 217, № 2. – P. 327-339.
66. Abdel-Massih, R. M. In vitro biosynthesis of 1, 4- $\beta$ -galactan attached to a pectin-xyloglucan complex in pea / R. M. Abdel-Massih, E. A-H. Baydoun, C. T. Brett // *Planta*. – 2003. – Vol. 216, № 3. – P. 502-511.
67. Hayashi, T. Xyloglucans in the primary cell wall / T. Hayashi // *Annual review of plant biology*. – 1989. – Vol. 40, № 1. – P. 139-168.
68. Polysaccharides, tightly bound to cellulose in cell wall of flax bast fibre:

- Isolation and identification / O. P. Gurjanov, N. N. Ibragimova, O. I. Gnezdilov, T. A. Gorshkova // Carbohydrate polymers. – 2008. – Vol. 72, № 4. – P. 719-729.
69. Galactans and cellulose in flax fibres: putative contributions to the tensile strength / R. Girault, F. Bert, C. Rihouey [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 1997. – Vol. 21, № 1-2. – P. 179-188.
70. Cosgrove, D. J. Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement / D. J. Cosgrove // The Plant Cell. – 1997. – Vol. 9, № 7. – P. 1031.
71. Proseus, T. E. Periplasm turgor pressure controls wall deposition and assembly in growing Chara corallina cells / T. E. Proseus, J. S. Boyer // Annals of Botany. – 2006. – Vol. 98, № 1. – P. 93-105.
72. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants / S. C. Fry, R. C. Smith, K. F. Renwick [et al.] // Biochemical Journal. – 1992. – Vol. 282, № 3. – P. 821-828.
73. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture / J. P. Vincken, H. A. Schols, R. J. Oomen [et al.] // Plant physiology. – 2003. – Vol. 132, №4. – P. 1781-1789.
74. Sriamornsak, P. Development of sustained release theophylline pellets coated with calcium pectinate / P. Sriamornsak, S. Prakongpan, S. Puttipipatkachorn, R. A. Kennedy // Journal of controlled release. – 1997. – Vol. 47, № 3. – P. 221-232.
75. Günter, E. A. Calcium pectinate gel beads obtained from callus cultures pectins as promising systems for colon-targeted drug delivery / E. A. Günter, O. V. Popeyko // Carbohydrate polymers. – 2016. – №. 147. – P. 490-499.
76. Prezotti, F. G. Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlled delivery of drugs / F. G. Prezotti, B. S. F. Cury, R. C. Evangelista // Carbohydrate polymers. – 2014. – №. 113. – P. 286-295.
77. Remuñán-López, C. Mechanical, water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate films / C. Remuñán-López, R. Bodmeier // Journal of controlled release. – 1997. – Vol. 44, № 2-3. – P. 215-225.

78. Bulloch, M. N. Fentanyl pectin nasal spray: a novel intranasal delivery method for the treatment of breakthrough cancer pain / Bulloch, M. N., and A. M. Hutchison // *Expert Review of Clinical Pharmacology*. – 2013. – Vol. 6, № 1. – P. 9-22.
79. Pourjavadi, A. Smart pectin-based superabsorbent hydrogel as a matrix for ibuprofen as an oral non-steroidal anti-inflammatory drug delivery / A. Pourjavadi, S. Barzegar // *Starch-Stärke*. – 2009. – Vol. 61, № 3-4. – P. 173-187.
80. Pectin-based (LA-co-MAA) semi-IPNS as a potential biomaterial for colonic delivery of oxaliplatin / K. Ullah, M. Sohail, M. A. Buabeid [et al.] // *International journal of pharmaceutics*. – 2019. - № 569. – P. 118557.
81. Gelatin and pectin complex coacervates as carriers for cinnamaldehyde: Effect of pectin esterification degree on coacervate formation, and enhanced thermal stability / B. Muhoza, S. Xia, J. Cai [et al.] // *Food Hydrocolloids*. – 2019. - № 87. – P. 712-722.
82. Development of pectin-type B gelatin polyelectrolyte complex for curcumin delivery in anticancer therapy / F. Y. Shih, I. J. Su, L. L. Chu [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2018. – Vol. 19, № 11. – P. 3625.
83. A 3D printed chitosan-pectin hydrogel wound dressing for lidocaine hydrochloride delivery / J. Long, A. E. Etxeberria, A. V. Nand [et al.] // *Materials Science and Engineering: C*. – 2019. – № 104. – P. 109873.
84. An injectable, self-healing hydrogel system from oxidized pectin/chitosan/ $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$  / D. Q. Li, S. Y. Wang, Y. J. Meng [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – № 164. – P. 4566-4574.
85. Jamshidzadeh, F. Three-ply biocompatible pH-responsive nanocarriers based on HNT sandwiched by chitosan/pectin layers for controlled release of phenytoin sodium / F. Jamshidzadeh, A. Mohebali, M. Abdouss // *International journal of biological macromolecules*. – 2020. – № 150. – P. 336-343.
86. Conjugation of pectin biopolymer with Au-nanoparticles as a drug delivery system: Experimental and DFT studies / B. Khodashenas, M. Ardjmand, M. S. Baei, [et al.] // *Applied Organometallic Chemistry*. – 2020. – Vol. 34, № 6. – P.

e5609.

87. Rhamnogalacturonan-I based microcapsules for targeted drug release / A. J. Svagan, A. Kusic, C. De Gobba [et al.] // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, № 12. – P. e0168050.

88. Fibrin-Rhamnogalacturonan I Composite Gel for Therapeutic Enzyme Delivery to Intestinal Tumors / Faizullin, D., Valiullina, Y., Salnikov, V. [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24, № 2. P. 926.

89. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. DuBois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton [et al.] // Analytical chemistry. – 1956. – Vol. 28, № 3. – P. 350-356.