

P3-2016-81

В. А. Маслова*, М. А. Киселев

СТРУКТУРА МИЦЕЛЛ ХОЛАТА НАТРИЯ

Направлено в журнал «Кристаллография»

* Varya.Maslova@yandex.ru

Маслова В. А., Киселев М. А.
Структура мицелл холата натрия

P3-2016-81

Холат натрия является солью желчной кислоты и применяется как биологический детергент. Смешанные системы фосфолипид/холат натрия используются для исследования процесса самосборки мицелл и образования мицеллярных систем. Мицеллы, состоящие из смеси фосфолипид/холат натрия, выступают переносчиками лекарств через кожу. В работе исследована структура мицелл холата натрия методом малоуглового рассеяния нейтронов. Установлено, что средний радиус мицелл холата натрия составляет $(10,14 \pm 0,01)$ Å в интервале концентраций холата натрия от 25 до 100 ммоль.

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики им. И. М. Франка ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2016

Maslova V. A., Kiselev M. A.
The Structure of Sodium Cholate Micelles

P3-2016-81

Sodium cholate is a bile acid salt and is used as a biological detergent. The mixed systems of sodium phospholipid/cholate are used to study the self-assembly process of the formation of micelles and micellar systems. Micelles composed of a mixture of a phospholipid/sodium cholate are used as carriers of drugs through the skin. We have studied the structure of micelles of sodium cholate by small-angle neutron scattering. It was established that the average radius of sodium cholate micelles was (10.14 ± 0.01) Å in the sodium cholate concentration range from 25 to 100 mM.

The investigation has been performed at the Frank Laboratory of Neutron Physics, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2016

ВВЕДЕНИЕ

Исследования мицеллярных систем интересны для понимания процесса самосборки надмолекулярных агрегатов и прежде всего для разработки новых технологий создания транспортных систем для лекарств. Особый интерес представляют системы на основе солей желчных кислот, которые способны как солюбилизировать водонерастворимые лекарственные вещества в мицеллярной форме, так и при определенных условиях образовывать смешанные везикулы фосфолипид/соль желчной кислоты, которые солюбилизуют водонерастворимые и водорастворимые молекулы лекарства [1–4].

Соль желчной кислоты — холат натрия ($C_{24}H_{39}NaO_5$) (рис. 1) — является биологическим ионным детергентом, применяемым при реконструкции мембранных белков, а также для создания везикулярных переносчиков лекарств через кожу [1, 2]. Температурочувствительные смешанные системы фосфолипид/холат натрия очень удобны для исследования процессов самосборки липидного бислоя и образования везикулярных систем. При изменении температуры таких систем в одном образце можно наблюдать последовательность морфологических преобразований мицеллярных систем в везикулярные и обратно [1]. Эффективным методом исследования структуры и свойств смешанных систем фосфолипид/холат натрия является малоугловое рассеяние нейтронов [5]. Важный вопрос для интерпретации результатов этих иссле-

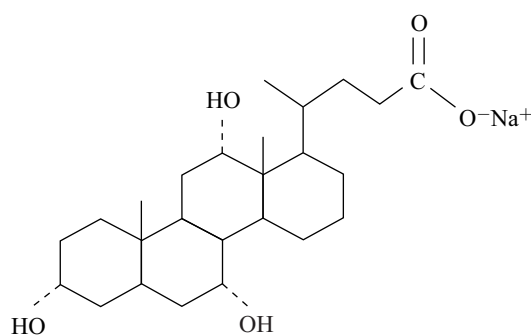


Рис. 1. Структура молекулы холата натрия

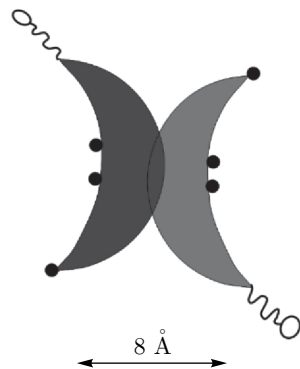


Рис. 2. Димер молекулы холата натрия

дований — вопрос о структуре и свойствах мицелл, состоящих из молекул холата натрия.

В предыдущие годы большое внимание уделялось исследованию структурных преобразований в смешанных двойных системах соль желчной кислоты/фосфолипид [3, 4, 6–12]. В этих работах делался акцент на структуру агрегатов, предшествующих образованию липидного бислоя (самосборка мембраны). Исследованию структуры мицеллярных систем, состоящих только из холата натрия, уделялось недостаточное внимание. Это связано прежде всего с малостью размеров таких мицелл и сложностью нейтронного эксперимента.

Было проведено исследование структуры мицелл холата натрия и дезоксихолата натрия методом малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН) [13]. При этом концентрация холата натрия и дезоксихолата натрия существенно превышала ККМ (критическую концентрацию мицеллообразования) и составляла 100 ммоль.

Основным результатом работы [13] было определение структуры мицелл, которая образуется при высокой концентрации холата натрия и дезоксихолата натрия. Было показано, что основным элементом структуры мицеллы является не мономер молекулы холата натрия, а димер молекулы (рис. 2) [13].

Молекула холата натрия, по данным [13], состоит из четырех димеров (рис. 3). Авторы работы [13] исходя из молекулярной структуры молекулы холата натрия предполагали, что при низких концентрациях холата натрия (концентрациях, близких к ККМ) структура мицеллы будет димером (первичная структура), а при повышении концентрации димеры будут агрегировать и образовывать структуру, названную вторичной и изображенную на рис. 3.

Образование вторичной структуры мицелл связано с особенностями структуры солей желчных кислот (см. рис. 1). Молекула холата натрия имеет гидрофобную поверхность на выпуклой стороне стероидного скелета и ги-

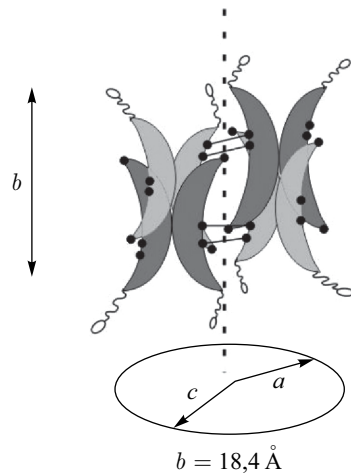


Рис. 3. Структура мицелл NaC при концентрации 100 ммоль. $a = c = 8 \text{ \AA}$, $b = 18,4 \text{ \AA}$

дрофильную поверхность, состоящую из гидроксила и карбоксилатных групп, на вогнутой стороне стероидного скелета. Взаимодействие между гидрофобными гранями приводит к образованию вторичной структуры мицелл [13]. Можно предположить, что в этом случае действуют короткодействующие слабые силы притяжения между соседними гидрофобными гранями — силы Ван дер Ваальса. Притяжение возникает за счет взаимодействия между индуцированными диполями [14].

В работе [13] исследовались только высокие концентрации холата натрия (100 ммоль), см. рис. 3. Высокие потоки установки ЮМО на импульсном реакторе ИБР-2 в сочетании с измерением величины вектора рассеяния по методу времени пролета позволяют за короткие времена проводить набор спектров от мицеллярных систем холата натрия при их низких концентрациях (25, 40, 50, 100 ммоль).

Представленная работа посвящена исследованию структуры мицелл холата натрия при низких концентрациях, исключаящих межмицеллярное взаимодействие.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Холат натрия, $C_{24}H_{39}O_5Na$, 99,9 % чистоты был получен от фирмы Serva. Буферный раствор на основе D_2O (pH 8,02) содержал 1 ммоль EDTA, 75 ммоль NaCl, 10 ммоль Трис-HCl, 0,02 % азиды натрия.

Эксперимент был выполнен на малоугловой установке ЮМО импульсного реактора ИБР-2 Лаборатории нейтронной физики Объединенного института

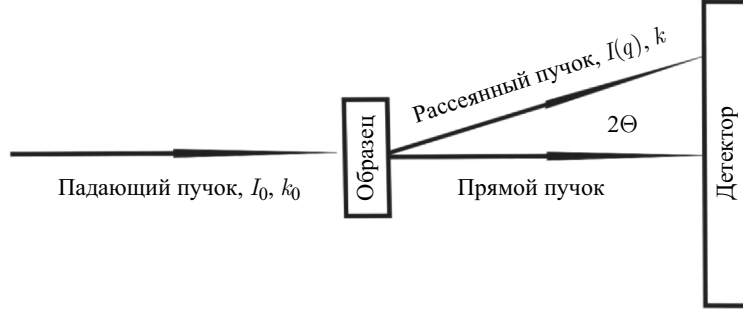


Рис. 4. Схема малоуглового эксперимента

ядерных исследований (Дубна) [15]. Схема малоуглового эксперимента представлена на рис. 4. Падающий пучок нейтронов интенсивностью I_0 рассеивается на образце на угол 2Θ . Интенсивность рассеянного пучка $I(q)$ регистрируется позиционно-чувствительным детектором. Нормировка осуществляется ванадиевым стандартом. Образцы с различными концентрациями заливались в разные кюветы (толщиной 2 мм), после чего помещались в специальные держатели. Набор спектров происходил при трех положениях детектора, соответствующих расстояниям образец–детектор $L_{sd} = 2, 6, 8$ м. Температура образца составляла 20°C .

Экспериментальные данные обрабатывались с помощью программы SANS View. Расчеты проводились по модели однородной сферы, в которой макроскопическое сечение рассеяния описывается выражением [5]

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega}(q) = \frac{\text{Scale}}{V} \left[\frac{3V\Delta\rho [\sin(qR) - qR \cos(qR)]}{(qR)^3} \right]^2 + \text{Bg}. \quad (1)$$

Здесь $\text{Scale} = nV$, n — количество мицелл в 1 см^3 , V — объем мицеллы; R — радиус сферической мицеллы; Bg — уровень некогерентного фона, а $\Delta\rho = (\rho_{\text{D}_2\text{O}} - \rho_{\text{NaC}})$ — контраст между тяжелой водой и мицеллой, где $\rho_{\text{D}_2\text{O}}$ — плотность длины рассеяния D_2O , ρ_{NaC} — средняя плотность длины рассеяния нейтрона мицеллой холата натрия (NaC); q — вектор рассеяния:

$$q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}, \quad (2)$$

$$|q| = |k - k_0|; \quad (3)$$

здесь $|q|$ — модуль вектора рассеяния, где k и k_0 — волновой вектор рассеянной волны и волновой вектор падающей волны соответственно:

$$k = \frac{2\pi}{\lambda}, \quad (4)$$

где λ — длина волны нейтрона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) для холата натрия составляет 13 ммоль, что соответствует $7,83 \cdot 10^{18}$ NaC/cm³ [13]. При концентрации 100 ммоль появляется межмицеллярное взаимодействие, которое мы учитываем при помощи структурного фактора в форме Hayter MSA Structure (система заряженных сферических объектов в диэлектрической среде). Это позволяет учитывать эффекты межмицеллярного взаимодействия, возникающего в исследуемой системе при увеличении концентрации мицелл холата натрия. Агрегационное число для мицеллы холата натрия равно 8 [13].

На основе модели однородной сферы с учетом межмицеллярного взаимодействия были описаны спектры малоуглового рассеяния нейтронов для следующих концентраций холата натрия: 25, 40, 50, 100 ммоль при pH = 8,1 (табл. 1 и 2). В наших расчетах предполагалось, что мицеллярная система монодисперсна. Учет полидисперсности (распределение мицелл по размерам) мицеллярной системы требует (ввиду малости размеров мицелл) более тщательных измерений в интервале векторов рассеяния, больших $0,3 \text{ \AA}^{-1}$.

Учет полидисперсности мицеллярной системы с помощью распределения Гаусса показал, что полидисперсность размера мицеллы пренебрежимо мала (сходится к нулю). На рис. 5 представлен экспериментальный спектр (точки) и расчетная кривая (сплошная линия) с учетом полидисперсности системы. Расчетная кривая хорошо описывает экспериментальный спектр, как показано на рис. 6. Расчет дает одинаковый результат с учетом полидисперсности и без него. Поэтому в дальнейшем полидисперсность системы не учитывалась.

Для всех концентраций были проведены расчеты по описанию экспериментальных спектров на основе формулы (1). Полученные параметры мицелл

Таблица 1. Параметры мицелл холата натрия в области малых концентраций при $\rho_{\text{NaC}} = 5,24 \cdot 10^{-17} \text{ \AA}^{-2}$

Концентрация, ммоль	Bg, см ⁻¹	Scale	R, Å	χ^2
25	0,006(1)	0,00100(1)	11,92(3)	1,1
40	0,007(1)	0,00350(3)	10,14(1)	9,3
50	0,006(1)	0,00680(4)	9,68(1)	11,7

Таблица 2. Параметры мицелл NaC при концентрации 100 ммоль, T = const = 293 К

Bg, см ⁻¹	Заряд	Диэлектрическая проницаемость	R, Å	Концентрация соли	Scale	SldSph, Å ⁻²	Объемная доля	χ^2
0,0460(4)	7,2(5)	5,9(4)	11,50(1)	0,0092(5)	0,63(7)	$0,258 \cdot 10^{-6}$	0,012(1)	1,6

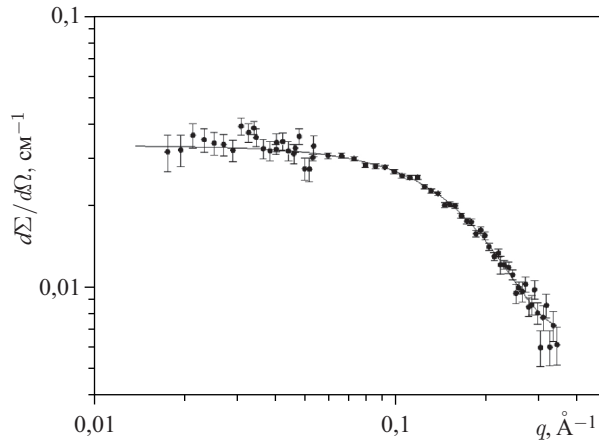


Рис. 5. Кривые малоуглового рассеяния для концентрации холата натрия 25 ммоль с учетом полидисперсности размера мицеллы. Точки — эксперимент, сплошная линия — расчет

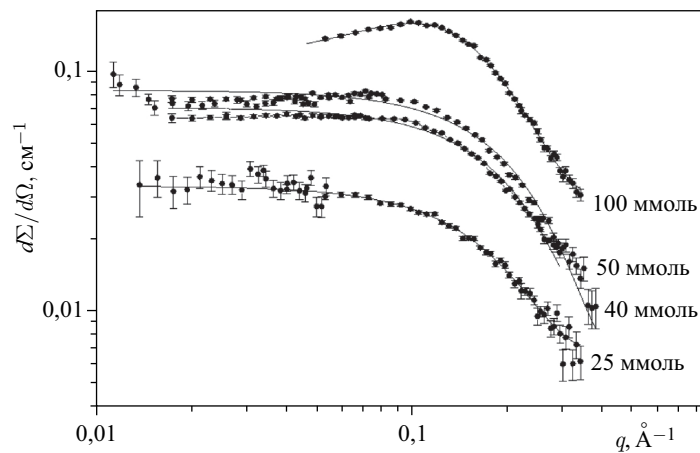


Рис. 6. Спектры малоуглового рассеяния нейтронов (точки) и расчетные кривые для концентраций холата натрия: 25, 40, 50, 100 ммоль; $T = 20^\circ\text{C}$

представлены в табл. 1 и 2. Рисунок 6 и χ^2 в табл. 1 и 2 демонстрируют хорошее соответствие экспериментальной и расчетной кривых.

На рис.6 представлены кривые малоуглового рассеяния от мицеллярных систем холата натрия при концентрациях холата натрия 25, 40, 50 и 100 ммоль. Здесь точки обозначают экспериментально измеренный спектр малоуглового рассеяния нейтронов от мицеллярной системы холата натрия, а линии — расчетные кривые.

При концентрациях NaC 25 и 40 ммоль межмицеллярное взаимодействие слабое, и его можно не учитывать, поэтому кривые хорошо описываются формфактором мицеллы. При 50 ммоль межмицеллярное взаимодействие начинает появляться, но не требует детального описания и введения структурного фактора. При 100 ммоль взаимодействие выражается очень явно, и его приходится описывать, вводя структурный фактор. На рис. 6 видно, что при малых концентрациях кривую хорошо описывает сферическая модель.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе была исследована структура мицелл холата натрия в области малых концентраций методом малоуглового рассеяния нейтронов. Спектры от образцов были получены на установке ЮМО. Обработка нейтронограмм проводилась в программе SansView в приближении монодисперсной сферической системы.

Установлено, что сферическое приближение достаточно хорошо описывает экспериментальный спектр. Радиус мицелл составляет $(11,92 \pm 0,02)$ Å при концентрации холата натрия 25 ммоль. При увеличении концентрации холата натрия происходит незначительное уменьшение радиуса мицеллы R : $R = (10,14 \pm 0,01)$ Å при концентрации холата натрия 40 ммоль и $R = (9,68 \pm 0,01)$ Å при концентрации холата натрия 50 ммоль. Учет структурного фактора при концентрации холата натрия 100 ммоль дает $R = (11,50 \pm 0,01)$ Å, что достаточно близко к значению радиуса $(11,90 \pm 0,02)$ Å, полученному при 25 ммоль холата натрия. Увеличение концентрации холата натрия не сопровождается увеличением размера мицелл. Усредненное значение радиуса по всем концентрациям составляет $\langle R \rangle = 10,8$ Å.

Определены концентрации, при которых межмицеллярное взаимодействие пренебрежимо мало (25–40 ммоль) и спектры малоуглового рассеяния достаточно хорошо описываются без введения структурного фактора.

Из результатов видно, что при увеличении концентрации появляется межмицеллярное взаимодействие, в котором необходимо учитывать структурный фактор, в данном случае Hayter MSA Structure.

Важным результатом является монодисперсность мицеллярной системы. Работа финансировалась РФФ, грант 14-12-00516.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дубачев Г. Э. и др. Электронно-микроскопическое исследование переходных структур при термоиндуцируемой трансформации мицеллы-везикулы в системе димиристоилфосфатидилхолин–холат натрия // Биологические мембраны. 1996. Т. 13, № 1.
2. Tanford Ch. The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes. A Wiley Intersci. Publ., 1973.

3. *Cevc G., Schatzlein A., Richardsen H.* Ultradformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label SLSM experiments and direct size measurements // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. V. 564. P. 21–30.
4. *Lesieur P. et al.* Temperature induced micelle to vesicle transition: Kinetic effects in the DMPC / NaC system // *J. Appl. Cryst.* 2000. V. 33. P. 623–627.
5. *Свергун Д. И., Фейгин Л. А.* Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. М.: Наука, 1986.
6. *Kiselev M. A. et al.* Membrane Self Assembly in Mixed DMPC/NaC Systems by SANS // *Chem. Phys.* 2008. V. 345. P. 173–180.
7. *Hjelm R. P., Alkan M. H., Thiagarajan P.* Small-Angle Neutron Scattering Studies of Mixed Bile Salt-Lecithin Colloids // *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 1990. V. 180A. P. 155–165.
8. *Long M. A. et al.* Characterization of Lecithin-Taurodeoxycholate Mixed Micelles Using Small-Angle Neutron Scattering and Dynamic Light Scattering // *J. Phys. Chem.* 1994. V. 98. P. 4402–4410.
9. *Hjelm R. P., Jr., Thiagarajan P., Alkan-Onyuksel H.* Organization of Phosphatidylcholine and Bile Salt in Rodlike Mixed Micelles // *J. Phys. Chem.* 1992. V. 96.
10. *Alla I. et al.* Temperature-induced micellar-lamellar transformation in binary mixtures of saturated phosphatidylcholine with sodium cholate // *FEBS Lett.* 1995. V. 358. P. 17–22.
11. *Schurtenberger P., Mazer N., Känzig W.* Micelle to Vesicle Transition in Aqueous Solution of Bile Salt and Lecithin // *J. Phys. Chem.* 1985. V. 89. P. 1042–1049.
12. *Полозова А. И. и др.* Аномальное термотропное поведение бинарных смесей, насыщенных фосфатидилхолинов с холатом натрия // *Биоорганическая химия.* 1993. Т. 19, № 6.
13. *Santhanalakshmi J. et al.* Small-angle neutron scattering study of sodium cholate and sodium deoxycholate interacting micelles in aqueous medium. MS received 21 July 2000; revised 23 November 2000.
14. *Геннис Р.* Биомембраны. Молекулярная структура и функции. М.: Мир, 1997.
15. <http://flnp.jinr.ru/>.

Получено 29 ноября 2016 г.

Редактор *Е. В. Сабеева*

Подписано в печать 11.01.2017.

Формат 60 × 90/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 0,69. Уч.-изд. л. 0,84. Тираж 210 экз. Заказ № 58993.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6.

E-mail: publish@jinr.ru

www.jinr.ru/publish/