

УДК 538.9

ИССЛЕДОВАНИЕ НАНОЛЕКАРСТВА “ФОСФОЛИПОВИТ” МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ НЕЙТРОНОВ

© 2019 г. М. А. Киселев^{1,2,7,*}, Д. Н. Селяков^{2,1}, И. В. Гапон^{1,3}, А. И. Иваньков^{1,3}, О. М. Ипатова⁴, В. Л. Аксенов^{1,2,5}, М. В. Авдеев^{1,6}

¹ Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Киевский национальный университет, Киев, Украина

⁴ Институт биомедицинской химии РАН, Москва, Россия

⁵ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

⁶ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁷ Дубненский университет, Дубна, Россия

*E-mail: kiselev@jinr.ru

Поступила в редакцию 04.06.2018 г.

После доработки 29.11.2018 г.

Принята к публикации 06.12.2018 г.

Методом малоуглового рассеяния нейтронов исследована структура водных растворов лекарственного препарата “Фосфолипovit”, предназначенного для транспортировки молекул не растворимых в воде лекарств. “Фосфолипovit” может использоваться независимо, например, при острых отравлениях. Для обработки экспериментальных данных дополнительно с помощью нейтронной рефлектометрии определены рассеивающие характеристики буферных растворов мальтозы, в которых находится препарат. Показано, что “Фосфолипovit” образует в таких растворах устойчивые к температуре (диапазон 20–37°C) везикулы критически малого размера с сопоставимыми внутренним радиусом (~40 Å) и толщиной липидного бислоя (~31 Å). Определены чувствительность параметров везикул к росту концентрации препарата в растворе (до 25 мас. %) и характер взаимодействия везикул, указывающий на присутствие большого по величине заряда на их внешней поверхности.

DOI: 10.1134/S002347611904012X

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственный препарат “Фосфолипovit” (разработка Научно-исследовательского института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва) представляет собой композицию соевых фосфолипидов, оказывающую терапевтическое воздействие на человеческий организм [1, 2]. Одновременно “Фосфолипovit” может использоваться как переносчик не растворимых в воде лекарств. Основной лекарственной субстанцией “Фосфолиповита” являются соевые фосфолипиды, терапевтическая эффективность которых доказана клинически. Препарат представляет собой лиофильно высушенный порошок, стабильный при комнатной температуре, хранящийся в порошке мальтозы в отношении 1 : 4. Молекулы мальтозы обеспечивают химическую стабильность лекарства. При регидратации “Фосфолиповита” образуется наноэмульсия с частицами очень малого размера. Подобные структуры (нанолекарства) составляют большую часть совре-

менного рынка бионанотехнологий, поэтому их изучение актуально не только с фундаментальной, но и с практической точки зрения.

Для успешного применения везикул и мицелл фосфолипидов как лекарственных препаратов и переносчиков нанолекарств, а также для детального понимания механизма их прохождения в организм человека необходимо знать их размеры и структуру. Ввиду малого размера данных объектов (менее 100 нм) методы малоуглового рассеяния тепловых нейтронов (МУРН) и рентгеновских лучей (в том числе синхротронного излучения) наиболее информативны для выяснения структурной организации ассоциатов (пространственных объединений) фосфолипидов как в модельных [3, 4], так и непосредственно в практических препаратах [5]. В настоящей работе приведены результаты изучения структуры “Фосфолиповита” в виде раствора методом МУРН. Для обеспечения достаточного контраста и уменьшения некогерентного фона исследуемые растворы приго-

тавливали на основе тяжелой воды (D_2O). Наличие дополнительного компонента (мальтозы) в практической системе усложняет структурный анализ. В частности, это потребовало дополнительного независимого определения плотности длины рассеяния (ПДР) буферных растворов мальтозы в D_2O . Для этой цели использовали два подхода. Сначала применяли нейтронную рефлектометрию зеркального отражения на границе раздела раствора с кристаллическим кремнием. Пучок нейтронов направлялся через кремний на границу раздела с жидкой средой, которая из-за тяжелой воды как основного компонента является оптически более плотной для нейтронов. Такое сочетание позволяет наблюдать полное отражение нейтронного пучка от границы раздела, а из наблюдаемого критического значения проекции вектора рассеяния на перпендикулярное направление находить ПДР жидкой среды. Также ПДР определена из прецизионных измерений массовой плотности растворов при варьировании содержания мальтозы. В результате анализа данных МУРН изучены морфология и форма ассоциатов в растворе “Фосфолиповита”, а также характер их взаимодействия, и исследована чувствительность параметров формы к концентрации.

ОЦЕНКИ ПЛОТНОСТИ ДЛИНЫ РАССЕЯНИЯ РАСТВОРОВ МАЛЬТОЗЫ В ТЯЖЕЛОЙ ВОДЕ

Измерения ПДР растворов мальтозы ($C_{12}H_{22}O_{11}$) в тяжелой воде необходимы для точной обработки данных малоуглового эксперимента по определению структуры ассоциатов лекарственного препарата “Фосфолиповит”, образующих взвесь в таком растворе. При приготовлении раствора порошок мальтозы добавляли в тяжелую воду, варьируя его массовую долю, которая составляла 4, 10 и 20%. Эксперимент по нейтронной рефлектометрии проводили на рефлектометре ГРЭИНС на импульсном реакторе ИБР-2 ЛНФ ОИЯИ (Дубна, Россия) [6]. Установка с горизонтальной ориентацией плоскости образца работает в режиме времени пролета. Коллимированный плоский пучок нейтронов направлялся в специальную ячейку через блок-подложку с низким поглощением (кристаллический кремний) и попадал на плоскую границу раздела с раствором мальтозы. Наклон пучка (~5 мрад) по отношению к поверхности контакта подложки с раствором обеспечивали с помощью отклоняющего нейтронного зеркала (длина зеркала 1 м, расстояние зеркало—образец 3 м). Зеркально отраженный пучок регистрировал двумерный позиционно-чувствительный детектор (размер 20×20 см, разрешение 2×2 мм, расстояние образец—детектор 3 м), усредняя отраженный пучок вдоль горизонтального направления. Интенсивность рассеяния из-

меряли как функцию проекции вектора рассеяния на перпендикулярное направление $q_z = (4\pi/\lambda)\sin\theta \approx 4\pi\theta/\lambda$, где θ — фиксированный (5 мрад) угол скольжения, а λ — длина волны нейтронов в диапазоне 0.1–0.6 нм (тепловой режим замедлителя на ИБР-2). Кривую отражения получали делением на спектр пустого пучка, измеряемого отдельно (без ячейки). Полученные кривые отражения обрабатывали с помощью программы Sasview 3.0.0. [7]. Калибровку установки проводили с использованием многослойных пленок-стандартов, которые предварительно были откалиброваны с помощью рентгеновской рефлектометрии (установка Bruker D8 DISCOVER, Центр рентгенодифракционных исследований СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия). Также был откалиброван кремниевый кристалл-подложка, используемый в нейтронных экспериментах.

Для границы раздела двух полубесконечных сред (кремниевая подложка и жидкость) кривая зеркального отражения следует закону Френеля:

$$R(k_z) = 1, \quad k_z < k_{c,12}, \quad (1a)$$

$$R(k_z) = \frac{\left| 1 - \sqrt{1 - \left(\frac{k_{c,12}}{k_z} \right)^2} \right|^2}{\left| 1 + \sqrt{1 - \left(\frac{k_{c,12}}{k_z} \right)^2} \right|^2}, \quad k_z > k_{c,12}, \quad (1b)$$

где $k_{c,12}$ — критические значения проекции вектора рассеяния на направление, перпендикулярное границе раздела двух сред с соответствующими плотностями длины рассеяния ρ_1 , ρ_2 , которые определяются как

$$k_{c,12}^2 = 4\pi(\rho_2 - \rho_1). \quad (2)$$

При известной ПДР первой среды (кремний) из экспериментально найденных значений $k_{c,12}$ оценивали плотность ρ_2 . Такая оценка не требует никаких допущений и является наиболее “прямым” способом определения искомой ПДР. На рис. 1 для сравнения представлены экспериментальные кривые отражения нейтронов и расчетные кривые Френеля; величины ρ_2 , полученные с использованием (2), даны на рис. 2 и собраны в табл. 1.

Альтернативный предыдущему способ оценки ПДР растворов при различных концентрациях мальтозы — измерение массовой плотности раствора ρ с последующим расчетом ПДР по формуле

$$\rho_n = \rho N_A \sum_i^k \frac{n_i b_i}{\mu_i}, \quad (3)$$

где n_i , b_i , μ_i — соответственно массовая концентрация, длина рассеяния и молярная масса i -го компонента раствора, N_A — число Авогадро. В случае раствора мальтозы в тяжелой воде имеем

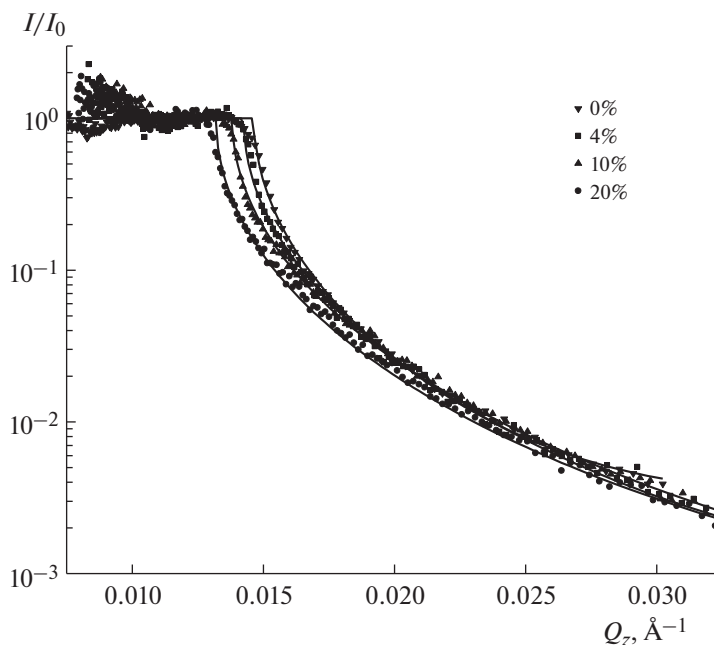


Рис. 1. Экспериментальные (точки) кривые зеркального отражения нейтронов от границы раздела кремний—раствор мальтозы в тяжелой воде при разных концентрациях мальтозы (мас. %). Сплошные линии — аппроксимации законом Френеля (1).

$$\rho_n = \rho(n_m) N_A \left(\frac{n_m b_m}{\mu_m} + \frac{(1 - n_m) b_{D_2O}}{\mu_{D_2O}} \right), \quad (4)$$

$$\begin{aligned} \rho(n_m) &= \frac{\sum m}{V} = \frac{n_m m_m + (1 - n_m) m_{D_2O}}{V} = \\ &= \frac{n_m(m_m - m_{D_2O}) + m_{D_2O}}{V}, \end{aligned} \quad (5)$$

где n_m , $n_{D_2O} = (1 - n_m)$ — массовые концентрации мальтозы и тяжелой воды; b_m , b_{D_2O} — длины рассеяния компонентов раствора; μ_m , μ_{D_2O} — молярная масса компонентов; $\rho(n_m)$ — функция зависимости массовой плотности раствора от концентрации мальтозы.

Для получения зависимости $\rho(n_m)$ на плотнометре DMA 5000M (ЛНФ ОИЯИ) были измерены массовые плотности растворов с концентрациями 4, 8 и 20%, которые составили соответственно 1.118043, 1.131589, 1.173363 г/см³ (ошибка плотнометра 10^{-6} г/см³). В результате получили зависимость

$$\begin{aligned} \rho(n_m) &= 0.3463(\pm 0.002)n_m + \\ &+ 1.10406(\pm 0.001) \text{ г/см}^3. \end{aligned} \quad (6)$$

Зная $\rho(n_m)$ и молярные массы/длины рассеяния молекул раствора ($\mu_{D_2O} = 20$, $\mu_m = 342.3$ г/моль, $b_{D_2O} = 1.92 \times 10^{-12}$, $b_m = 6.28 \times 10^{-12}$ см), получили зависимость плотности длины рассеяния раствора от концентрации мальтозы (рис. 2), которая

соответствует формуле (4). Сравнение двух видов оценки зависимостей показывает, что отклонение результатов не превышает 5%, что с учетом разрешения экспериментальной установки (нейтронный рефлектометр) $\sim 5\%$ является достаточно надежным результатом.

АНАЛИЗ ДАННЫХ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ НЕЙТРОНОВ

Ниже приведены результаты анализа структуры лекарства “Фосфолипovit” в растворах по данным малоуглового рассеяния нейтронов. Экс-

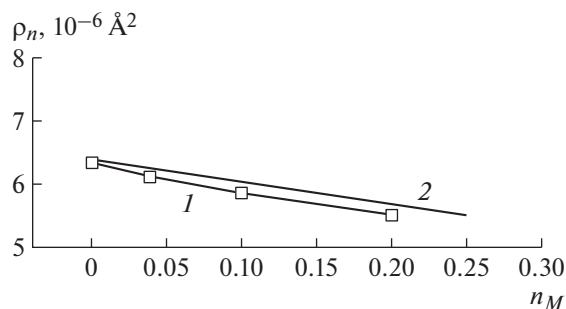


Рис. 2. Два способа оценки зависимости ПДР раствора мальтозы в тяжелой воде от концентрации мальтозы (массовая доля n_m): 1 — из экспериментов по нейтронной рефлектометрии (ошибки не превышают размер точек); 2 — из измерений массовой плотности раствора (ошибки не превышают толщину линии).

Таблица 1. Сравнение значений ПДР растворов мальтозы в тяжелой воде, полученных двумя способами: из экспериментов по нейтронной рефлектометрии (ПДР1) и расчета с использованием значений измеренной массовой плотности (ПДР2)

Концентрация мальтозы, мас. %	ПДР1, $10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$	ПДР2, $10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$	Относительное отклонение, %
0	6.34	6.38	1
4	6.10	6.25	3
10	5.86	6.05	3
20	5.53	5.69	3

перименты проводили на времяпролетной малоугловой установке ЮМО на импульсном реакторе ИБР-2 ЛНФ ОИЯИ (Дубна, Россия) [8]. Интенсивность рассеяния (дифференциальное сечение рассеяния, приведенное к единичному объему образца), изотропную по радиальному углу φ на детекторе большой площади (размер ~ 90 см), получали как функцию модуля вектора рассеяния, $q = (4\pi/\lambda)\sin(\theta/2)$, где θ – угол рассеяния, λ – длина волны нейтронов в диапазоне 0.05–0.5 нм. Для получения кривых рассеяния в диапазоне $q = 0.08$ – 4.0 нм^{-1} использовали два детектора, расположенные за образцом на расстояниях 4 и 16 м. Для калибровки интенсивности применяли ванадиевый стандарт. Все жидкие образцы помещали в кварцевые кюветы Hellma (оптический путь 2 мм). Температуру на образце (диапазон 20–37°C) во время эксперимента поддерживали с помощью термостата с автоматическим контролем. Рассеяние на буферных растворах измеряли отдельно и вычитали из рассеяния на растворах. Первичную обработку данных выполняли с использованием программы SAS и режима сглаживания [9].

Интенсивность малоуглового рассеяния на ассоциатах в растворах моделировали стандартным образом [3, 4]:

$$\frac{d\Sigma}{d\Omega} = AF(q)S(q) + B, \quad (7)$$

где $F(q)$ – формфактор ассоциата, $S(q)$ – структурный фактор, определяемый характером взаимодействия ассоциатов между собой, A – объемная концентрация ассоциатов (число частиц в 1 см^3), B – остаточный фон после вычитания рассеяния на буферном растворе.

Формфактор ассоциата моделировали в однородном приближении, предполагая ПДР постоянной и рассматривая две возможные формы: анизотропную мицеллу и сферическую везикулу.

В первом случае мицеллы представляли собой эллипсоиды вращения с формфактором рассеяния [10]:

$$F(q) = \Delta\rho V \int_0^1 J[qa\sqrt{1+x^2(v^2-1)}]dx. \quad (8)$$

Здесь $J(x) = 3 \frac{\sin(x) - x \cos(x)}{x^2}$, $\Delta\rho$ – разность ПДР мицеллы и раствора, V – объем мицеллы, a – малая полуось эллипсоида, v – отношение большой и малой полуосей.

Формфактор сферической везикулы, когда растворитель с мальтозой свободно проникает в ее полость при сборке, имеет вид

$$F(q) = \Delta\rho \left[\left(\frac{3V_2 J(qR_2)}{qR_2} \right) - \left(\frac{3V_1 J(qR_1)}{qR_1} \right) \right], \quad (9)$$

где V_1 , R_1 , V_2 , R_2 – объемы и радиусы внутренней и внешней сфер везикулы, $\Delta\rho$ – разность ПДР бислойа и раствора.

Зная значения ПДР раствора, можно с большей точностью определять параметры форм. В случае малой концентрации структурный фактор принимали равным единице. В случае больших концентраций (более 5%) для структурного фактора пробовали модель жестких сфер Hard Sphere Structure [11] и модель средней сферической аппроксимации Hayter MSA Structure [12, 13], представляемые программой Sasview 3.0.0. В первом случае потенциал взаимодействия описывается следующим образом:

$$U_{\text{hard sphere}} = \begin{cases} 0, & r \geq 2R, \\ \infty, & r < 2R. \end{cases} \quad (10)$$

Во втором случае между сферическими объектами, находящимися в диэлектрической среде, действует кулоновское отталкивание из-за заряда на поверхности:

$$U_{\text{HAYTER MSA}} = \begin{cases} \frac{\pi\epsilon\epsilon_0 D^2 \varphi_0^2 \exp(-k(r-2R))}{r}, & r \geq 2R, \\ \infty, & r < 2R. \end{cases} \quad (11)$$

Здесь $\varphi_0 = \frac{Z}{\pi\epsilon\epsilon_0 2(1+kR)}$ – поверхностный потенциал, $k = \left(\frac{ze^2 \bar{N}}{k_B T} \right)^{1/2}$, ϵ_0 – диэлектрическая постоянная, ϵ – диэлектрическая проницаемость среды, R – внешний радиус везикулы, z – заряд, $\bar{N}$ – количество везикул в единице объема. Структурный фактор $S(q)$ находится путем фурье-преобразования радиальной функции распределения $g(r)$,

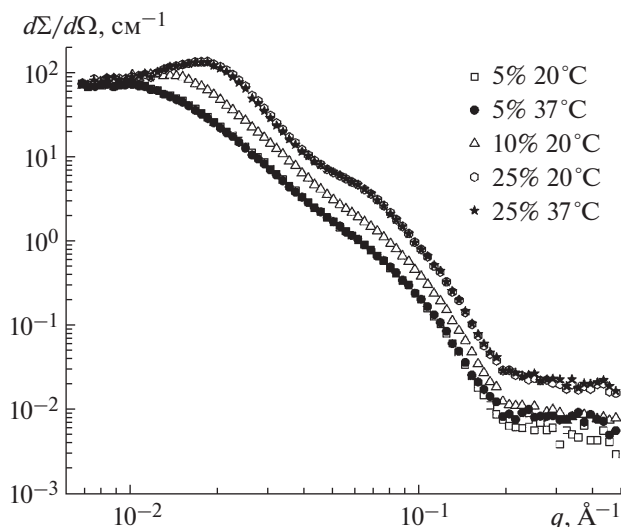


Рис. 3. Экспериментальные кривые малоуглового рассеяния нейтронов для растворов с различной концентрацией “Фосфолиповита” при разной температуре.

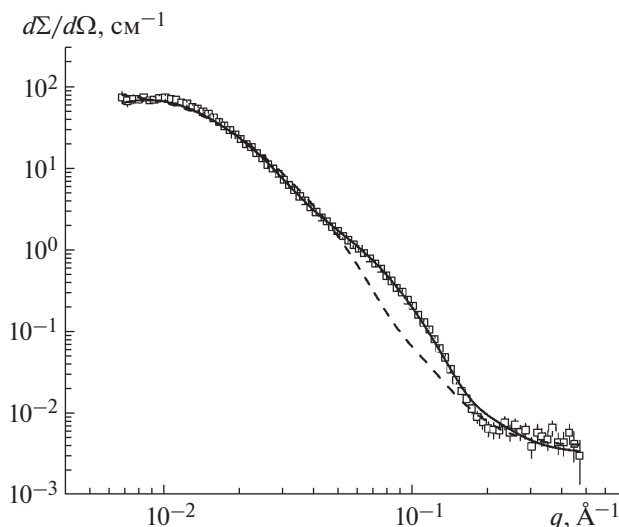


Рис. 4. Выбор модели формфактора липидных ассоциатов в 5%-ном растворе “Фосфолиповита” ($T = 20^\circ\text{C}$) при подгонке моделей “мицелла” ($\chi^2 = 209$) (штриховая линия) и “везикула” ($\chi^2 = 3.25$) (сплошная линия).

рассчитываемой по программе SASview исходя из заданных параметров потенциалов взаимодействия.

Изменения кривой МУРН с ростом концентрации прослеживаются на рис. 3. Дополнительно проверяли температурную стабильность раствора. Относительные изменения кривых рассеяния при концентрациях лекарства 5 и 25% при температурах 20 и 37°C не превышают 5%, что говорит о том, что исследуемые объекты стабильны при изменении температуры в биологическом диапазоне. Сравнение подгоночных кривых с экспериментальными данными (рис. 4) для разных формфакторов с большой степенью досто-

верности позволяет говорить, что препарат находится в растворе в форме везикул.

Тип взаимодействия определяли, используя кривую рассеяния концентрированного раствора (концентрация препарата 25%), где эффект структурного фактора наибольшим образом проявляется в области малых значений q . Из двух обозначенных ранее моделей взаимодействия в используемой программе обработки (Hard Sphere Structure и Hayter MSA Structure) наилучшим образом экспериментальную кривую описывает вторая модель (рис. 5), которая учитывает дополнительное кулоновское отталкивание везикул из-за заряда, аккумулирующегося на поверхности ассоциатов. Экспериментальные и расчетные кривые рассеяния для всех концентраций представлены на рис. 6 для сравнения. Параметры везикул собраны в табл. 2. Видно, что везикулы имеют критически малый размер, когда внутренний радиус везикулы (~ 40 Å) сопоставим с толщиной липидного бислоя (~ 31 Å). Оба структурных параметра везикул слабо меняются с ростом концентрации препарата в растворе. В то же время точность определения толщины липидного бислоя везикулы позволяет говорить о ее слабом ($\sim 4\%$), но различимом увеличении с ростом концентрации. Четкое указание на то, что везикулы “Фосфолиповита” взаимодействуют между собой как заряженные шарообразные частицы, говорит о наличии заряда на поверхности везикул.

Таблица 2. Полученные из модельных подгонок (с указанием χ^2 значения внутреннего радиуса и толщины липидного бислоя везикул для разных концентраций “Фосфолиповита” в буфере на основе тяжелой воды при комнатной температуре ($T = 20^\circ\text{C}$))

Концентрация “Фосфолиповита” в растворе, мас. %	r , Å	d , Å	χ^2
5	41.5 ± 0.3	30.8 ± 0.2	2.46
10	38.7 ± 0.3	31.2 ± 0.3	2.98
25	43.6 ± 0.2	32.0 ± 0.1	2.25

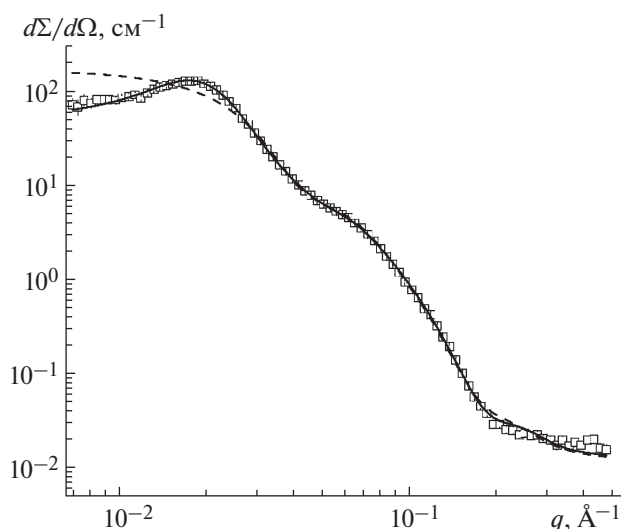


Рис. 5. Выбор модели структурного фактора везикул в 25%-ном растворе “Фосфолиповита” ($T = 20^\circ\text{C}$) при подгонке моделей Hard Sphere ($\chi^2 = 38.9$) (штриховая линия) и Hayter MSA Structure ($\chi^2 = 2.25$) (сплошная линия).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом малоуглового рассеяния нейтронов исследованы растворы лекарственного препарата “Фосфолиповит” в тяжелой воде с дополнительно содержащейся в них мальтозой, что необходимо в практических применениях. Показано, что “Фосфолиповит” в диапазоне концентраций до

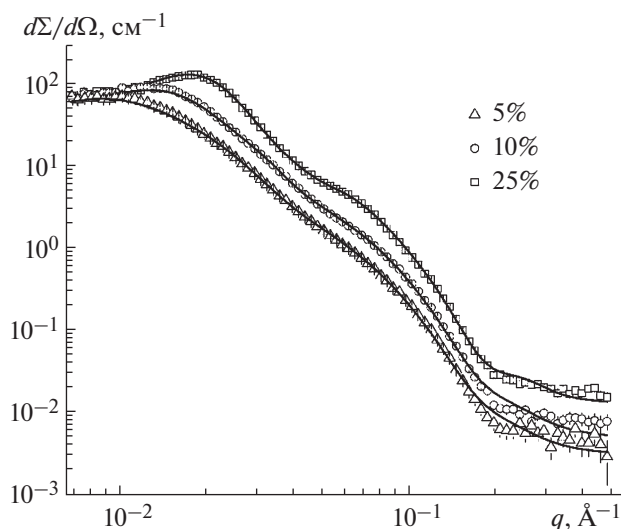


Рис. 6. Лучшие аппроксимации (сплошные линии) экспериментальных кривых МУРН (точки) согласно выражениям (7), (9), (10), (11) при $T = 20^\circ\text{C}$. Соответствующие параметры аппроксимаций собраны в табл. 2.

25 мас. % образует в таких растворах устойчивые к температуре (диапазон $20\text{--}37^\circ\text{C}$) везикулы с критически малым размером: внутренний радиус ($\sim 40 \text{ \AA}$) везикул сопоставим с толщиной липидного бислоя ($\sim 31 \text{ \AA}$). Толщина липидного бислоя везикул слабо увеличивается с ростом концентрации препарата. Выявлен зарядовый характер взаимодействия везикул в растворе, который предполагает наличие заряда на внешней поверхности везикул.

Авторы выражают благодарность Центру рентгенодифракционных исследований СПбГУ (Санкт-Петербург), где были получены калибровочные рентгеновские кривые отражения для многослойных пленок-стандартов и кремниевых подложек, в частности сотруднику центра И.А. Касаткину за помощь в проведении рефлектометрических экспериментов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-12-00516).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кудинов В.А., Ипатов О.М., Федоров И.Г. и др. // Биомедицинская химия. 2016. Т. 62. № 6. С. 704.
2. Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Игнатов Д.В. и др. // Биомедицинская химия. 2015. Т. 61. № 2. С. 219.
3. Kučerka N., Nagle J.F. // Phys. Rev. E. 2004. V. 69. P. 051903.
4. Kiselev M.A., Zemlyanaya E.V., Aswal V.K., Neubert R.H.H. // Europ. Biophys. J. 2006. V. 35. № 6. P. 477.
5. Kiselev M.A., Zemlyanaya E.V., Ermakova E.V. // J. Pharm. Biomed. Analysis. 2015. V. 114. P. 288.
6. Авдеев М.В., Боднарчук В.И., Петренко В.И. и др. // Кристаллография. 2017. Т. 62. № 6. С. 986.
7. <http://www.sasview.org/>
8. Kuklin A.I., Islamov A.K., Gordeliy V.I. // Neutron News. 2005. V. 16. № 3. P. 16.
9. Soloviev A.G., Murugova T.N., Islamov A.H. // J. Phys. Conf. Ser. 2012. V. 351. P. 012027.
10. Свєргун Д.И., Фейгин Л.А. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. М.: Наука, 1986. 279 с.
11. Percus J.K., Yevick J. // J. Phys. Rev. 1958. V. 110. P. 1.
12. Hayter J.B., Penfold J. // Mol. Phys. 1981. V. 42. P. 109.
13. Hansen J.P., Hayter J.B. // Mol. Phys. 1982. V. 46. P. 651.