

## Az epesavak önszerveződése és hidrogén hidas aggregátumai

### 1. Bevezetés

Az epesavak az ember lipid anyagcseréjének fontos elemei. Koleszterinből keletkeznek és számos jelentős funkcióval rendelkeznek. Mivel poláros és apoláros csoportokat egyaránt tartalmaznak, detergens tulajdonsággal rendelkeznek; a vékonybélben a táplálékkal elfogyasztott zsírokat emulgeálják, felületüket megnövelik és ezzel pancreaslipáz számára a lipideket hozzáférhetőbbé teszik. Ezenkívül a lipidek emésztését azért is gyorsítják mert közvetlenül aktiválják a lipáz enzimet. Továbbá, gén expresszió és enzim inhibíció által szabályozzák a koleszterin szintézisét és annak oldatban tartását, megakadályozva ezáltal a koleszterin kiválását és a koleszterinalapú kövek kialakulását. Végezetül a koleszterinkiválasztás lehetőségét az epesavak fiziológiás körülmények között a székklettel biztosítják.<sup>1</sup>

Az elmúlt 30 évben az epesavak gyógyszerészeti alkalmazásai kiterjedtek az epekövek feloldódásától a különböző gyógyszer molekula hordozóig.<sup>1,2</sup>

### 2. Az epesavak mint amfifil molekulák

Az ember és az emlős állatok májában enzimatikusan termelt epesavak a primer epesavak, a 5 $\beta$ -kolánsav hidroxil származékai (kólsav

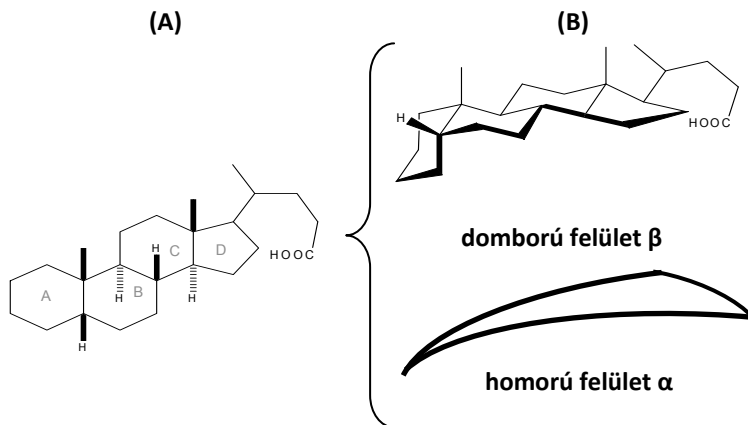
---

\* Dr. Pósa Mihály, egyetemi docens, Újvidéki Egyetem, Orvostudományi Kar, Gyógyszerészeti Tanszék, Újvidék

\*\* Dr. Csanádi János, rendes egyetemi tanár, Újvidéki Egyetem, Természettudományi Kar, Kémia Intézet, Újvidék

\*\*\* Dr. Gaál Ferenc, a Vajdasági Tudományos és Művészeti Akadémia levelező tagja, nyugalmazott egyetemi tanár, Újvidéki Egyetem, Természettudományi Kar, Kémia Intézet, Újvidék

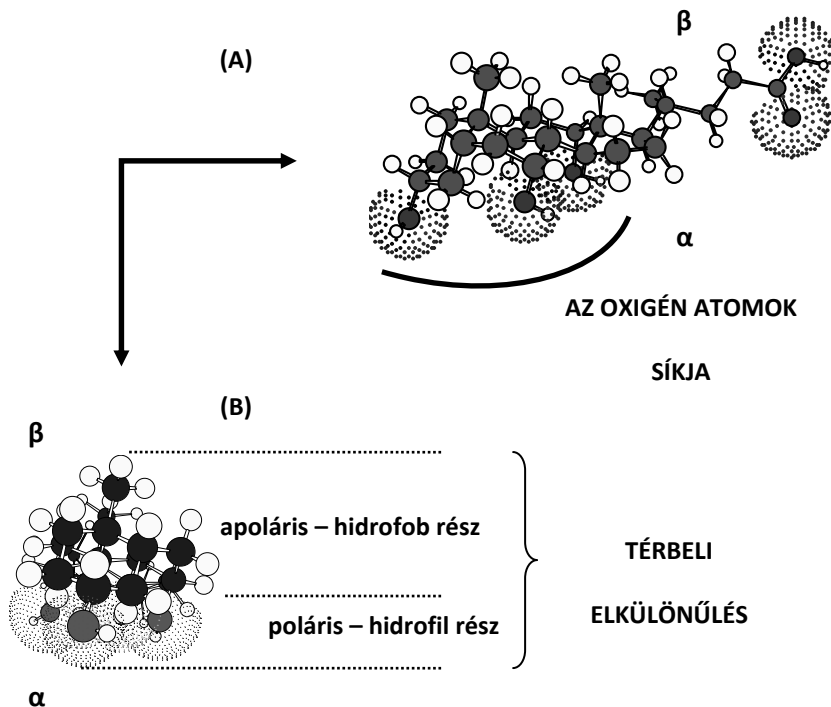
és a kenodeoxikólsav).<sup>1,2</sup> Tehát az epesavak tulajdonságát nagymértékben meghatározza a  $5\beta$ -kolánsav molekula geometriája. A  $5\beta$ -kolánsav molekula szteroid vázán megkülönböztethető egy domború ( $\beta$ ) és egy homorú ( $\alpha$ ) felület (1. ábra).<sup>3</sup>



1. ábra

*A  $5\beta$ -kolánsav molekula (A) és konformációs (B) képlete*

A kólsav és a kenodeoxikólsav hidroxil csoportjai a szteroid gyűrű rendszer  $\alpha$  oldalán találhatók. Továbbá Bertolossi röntgen difrakciós vizsgálatait<sup>4</sup> bebizonyították, hogy a C17-es szén atomon lévő oldallánc karboxil csoportja szintén az  $\alpha$  oldalon található, aminek köszönhetően az epesav molekulák amfifil tulajdonságúak. Szteroid vázuk homorú felülete ( $\alpha$ ) poláris – hidrofil, míg a szteroid váz domború felülete ( $\beta$ ) apoláris – hidrofób. Az epesavak az amfifil vegyületek külön csoportjába, a planáris polaritású molekulák csoportjába tartoznak. Ezt legjobban a kólsav szemlélteti (2. ábra.), mivel ennél a molekulánál az  $\alpha$  OH csoportok oxigén atomjai egy síkban, a poláris síkban találhatók.<sup>3,5</sup>



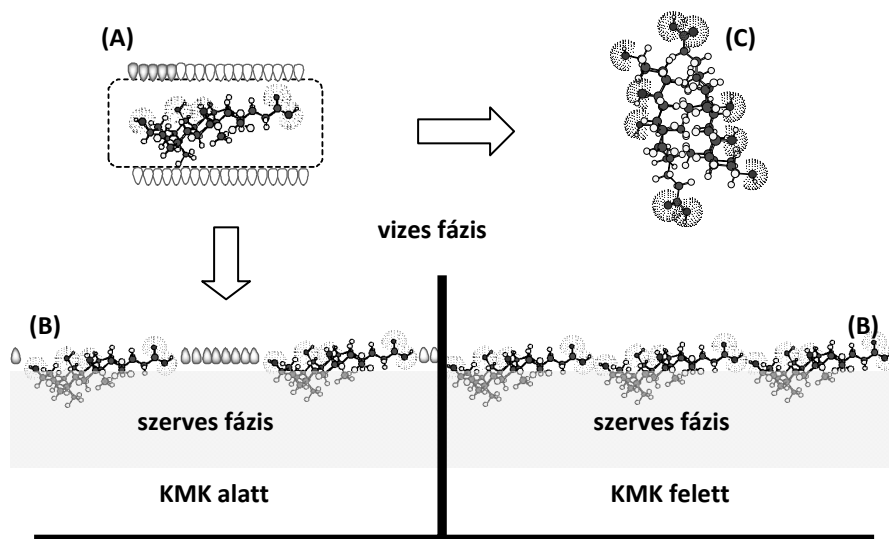
2. ábra

Planáris polaritás: kólsav oldalnézetből (A) és az A gyűrű irányából (B)

### 3. Az epesavak önasszociációja – micellaképződés

Az amfifil molekulákra jellemző a felületaktív tulajdonság. Így például az epesavak nátriumsói a vizes fázisból a határfelületbe beépülnek úgy, hogy az apoláros részük a levegőben, vagy a hidrofób szerves oldószerben van, míg a poláros részük az oldatban. Az epesavak nátriumsóinak az oldatbeli koncentrációja növelésével egyre több epesav ion épül be a határfelületbe. Ez a folyamat addig tart amíg az oldat felszíne nem telítődik epesav ionokkal, ugyanis ekkor az oldat felszínét monomolekuláris réteg borítja. Nagyobb koncentráció esetében az epesav ionok (monomer) önasszociációja, micella képződés áll be. *Small* szerint az epesav micellában a monomerek a szteroid vázuk  $\beta$  felületeivel „érintkeznek” és képezik a micella hidrofób magját, míg a monomerek  $\alpha$  oldala a vizes fázis felé mutat (primáris micella).<sup>6</sup> Kritikus

micelláris koncentrációnak (KMK) nevezik azt a monomer (epesav ion) koncentrációt amelynél az oldathoz újonnan hozzáadott monomerek azonnal micellákat képeznek (3. ábra).<sup>2,5</sup>

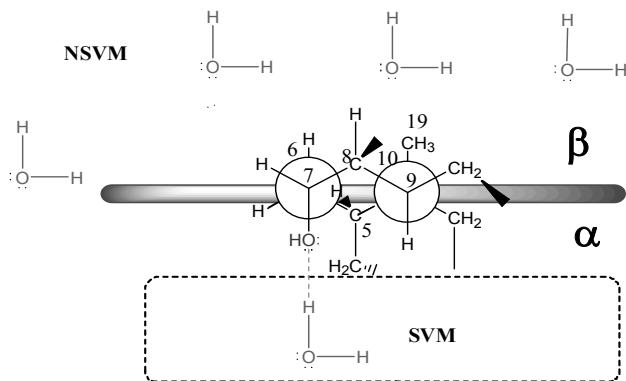


3. ábra

*Az epesavak önasszociációja (micella képződés), epesav ion – monomer víz molekulákkal (A), határfelület KMK alatt és felett (B), Small típusú primáris micella (C)*

#### 4. Mi készíti az epesavakat az önszerveződésre?

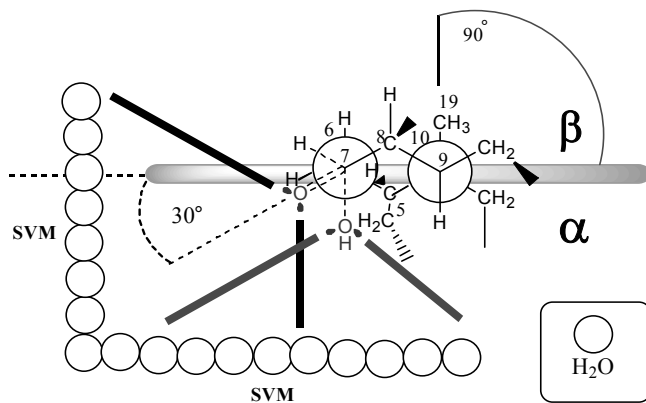
Pósa és társai oldékonysági vizsgálatokkal megállapították, hogy ha a kólsav OH csoportjait helyettesítik oxo (=O) csoportokkal akkor az új epesav molekuláknál az oxo csoportok számának a növelésével egyaránt nő a molekulák KMK értéke.<sup>7</sup> Ez azt jelenti, hogy az oxo (keto) epesavaknál csökken a micella képződésének hajlama. E szerint az epesavaknál a molekulák önszerveződésének hajlama függ az epesav ion hidratációs rétegében levő hidrogén kötéssel stabilizált víz molekulák (SVM) és a nem stabilizált víz molekulák (NSVM) arányától.<sup>8</sup> A kólsav C7 és C12 axiális  $\alpha$ -OH csoportjai hidrogén hidakkal kizárólag a szteroid váz  $\alpha$  oldalán lévő víz molekulákat stabilizálhatják (4. ábra).



4. ábra

A kólsav C7 OH csoportjának környéke Newman projekcióban, SVM- stabilizált víz molekulák, NSVM-nem stabilizált víz molekulák

Ha viszont valamelyik  $\alpha$  axiális OH csoport helyettesítődik oxo csoporttal akkor az oxo csoport oxigén atomjának az orientációja átmenetet képez az  $\alpha$  axiális OH és a  $\beta$  ekvatoriális OH orientációja között, tehát az oxo csoport O atomja a szteroid gyűrűrendszer közép síkjával  $30^\circ$ -os szöget zár be. Ez azt jelenti, hogy az oxo csoport képes hidrogén kötések létesíteni az epesav molekula  $\beta$  oldalán is, azaz növekszik az SVM-ák száma a hidratációs rétegben (5. ábra).

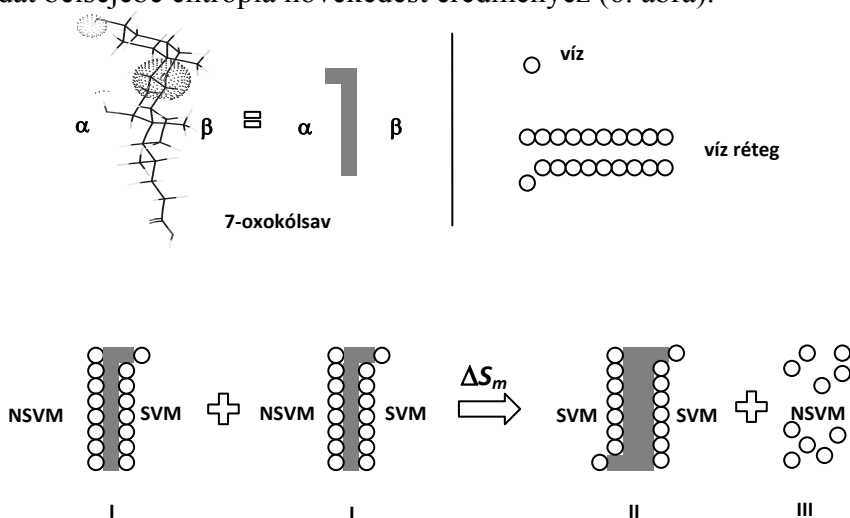


5. ábra

Az oxo csoport oxigén atomjának orientációja

Szobahőmérsékleten ( $35^\circ\text{C}$ -ig) az epesavak micella képződésének hajtóereje entrópia eredetű.<sup>8</sup> Miként a 6-os ábra mutatja, a monome-

rek I (epesav ionok) önszerveződésekor felszabaduló NSVM-áknak III a hidratációs réteghez képest az oldat belsejében megnő a szabadsági fokuk, tehát entrópia növekedést idéznek elő (ami nagyobb mint a dehidratált monomerek csoportosulásakor előidézett entrópia csökkenés). Az NSVM-ák jelentőségét az entrópia növekedésben igazolták Pósa és társai termodinamikai mérései<sup>8</sup>. Ugyanis, mint a kólsav oxo származékainak kongenerikus csoportjában, úgy a deoxikólsav és a kenodeoxikólsav oxo származékainak kongenerikus csoportjában a micella képződés entrópiája ( $\Delta S_{mic}$ ) csökken az oxo csoportok számának a növelésével. Továbbá mindkét csoportban a  $\Delta S_{mic}$  és olyan molekula deskriptorok között vannak szignifikáns lineáris modellek amelyek kapcsolatban állnak a molekulák hidrofil – hidrofób egyensúlyával (HLE). Valamely molekula HLE értékét a SVM és NSVM aránya határozza meg. Ezek szerint az oxo csoport okozta  $\Delta S_{mic}$  csökkenés kapcsolatban van a NSVM-ák számának a csökkenésével az epesav ion hidratációs burkában, így az oxo epesavaknál csökken a NSVM-ák mennyisége amelyek távozása az oldat belsejébe entrópia növekedést eredményez (6. ábra).

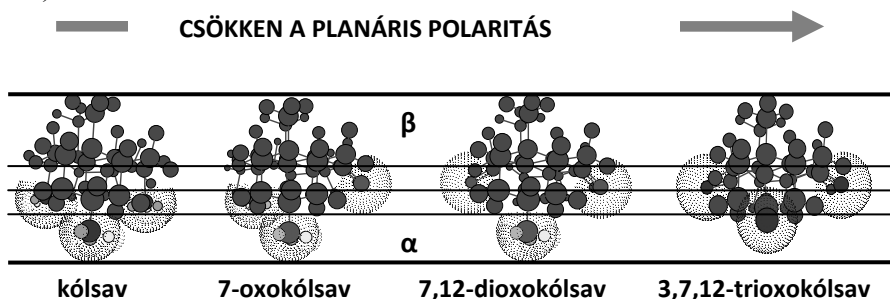


6. ábra

Micella képződés, I – monomér epesav ionok, II – epesav micella, III – a felszabadult NSVM-ák

Tehát, az oxo csoport számának a növelésével csökken az epesavak planáris polaritása (csökken az amfifilitásuk – növekszik a hidrofil

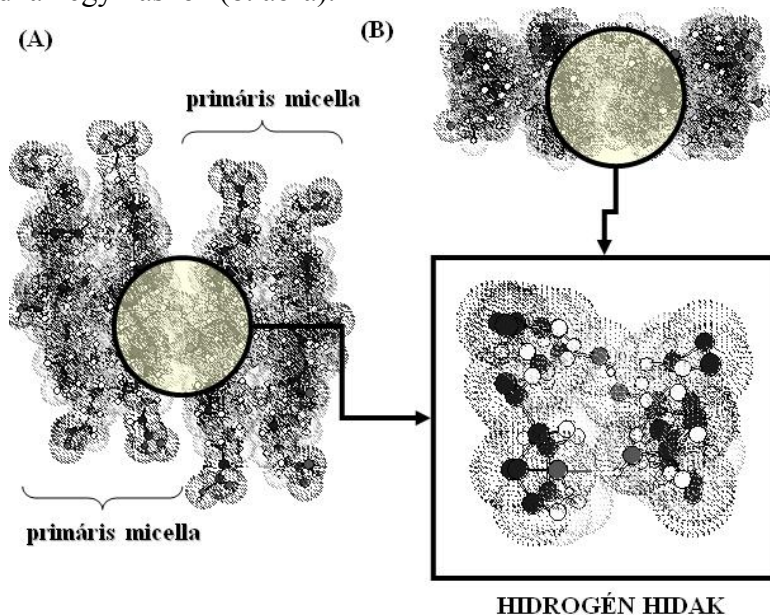
felületük) azaz csökken az önszerveződésük a hajlama ami a megnövekedett KMK értékben és a csökkent  $\Delta S_{mic}$  értékben mutatkozik meg (7. ábra).



7. ábra

*Az oxo csoport hatása a planáris polaritásra*

*Small* szerint a dihidroxi epesavak primáris micellái a KMK feletti koncentráció tartományban szekundáris micelláká csoportosulnak. A szekundáris micellákban a primáris micellák hidrogén hidakkal kapcsolódnak egymáshoz (8. ábra).<sup>6</sup>



8. ábra

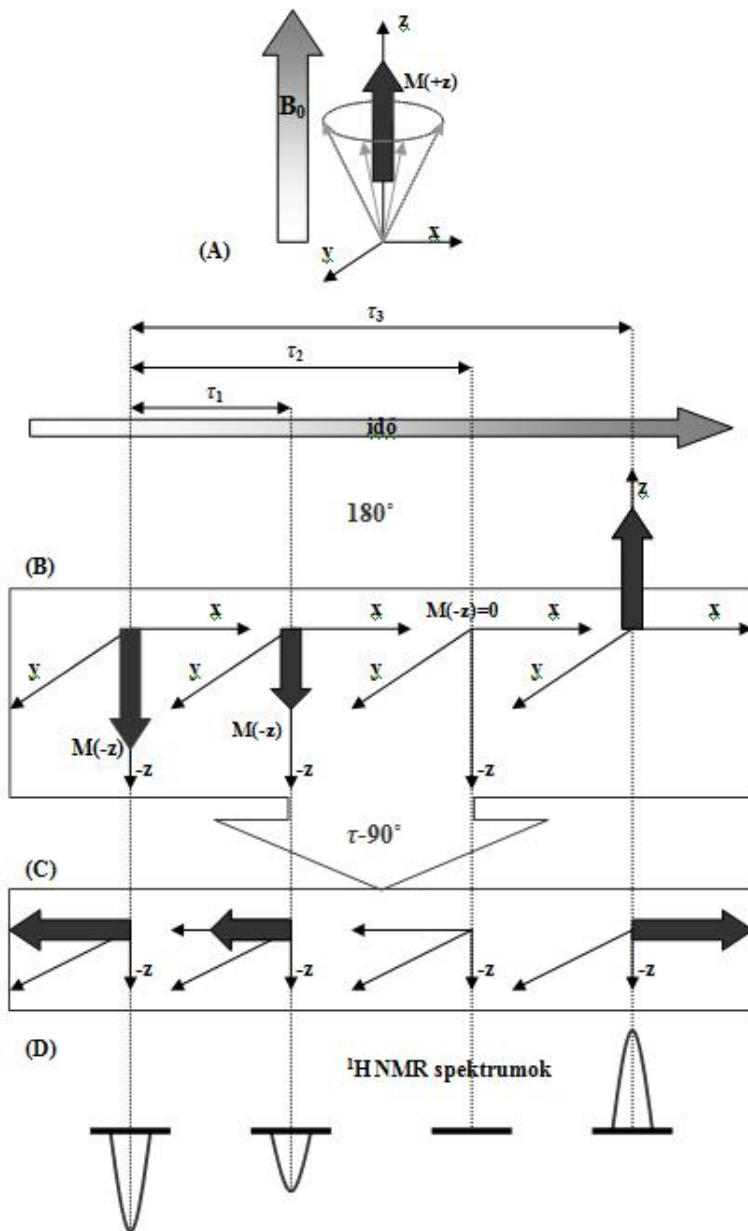
*Szekundáris micellák (hidrogén hidas aggregátumok), oldal nézet (A), felül nézet (B)*

A szekundáris micellák értékelése nem könnyű feladat, ugyanis a hagyományos oldékonysági eljárások vagy a minta molekula spektrumának az eltolódása nem alkalmazható, mivel ezeknél a módszereknél a hidrofób minta molekula a primáris micellák hidrofób ketrecébe épül be, ami viszont nem ad változást a szekundáris micellák keletkezésekor. A szekundáris micellák vizsgálatához leginkább újabb módszerek szükségesek. E módszerekhez tartoznak a derivatív pásztázó kalorimetriás (izotermikus) mikrotitrálás (DSIT), a lézer fény diffrakciója és az NMR relaxációs mérések. Az irodalom szerint a legérzékenyebb módszer a DSIT míg az NMR-es módszerek kevésbé érzékenyek az aggregációs folyamatok koncentráció függésének a követésére.<sup>5</sup> Viszont az NMR-es módszerek előnye, hogy meglehetősen határozni a molekulák kapcsolódási helyét.

#### 5. Az epesav aggregátumok vizsgálata NMR relaxációs módszerrel

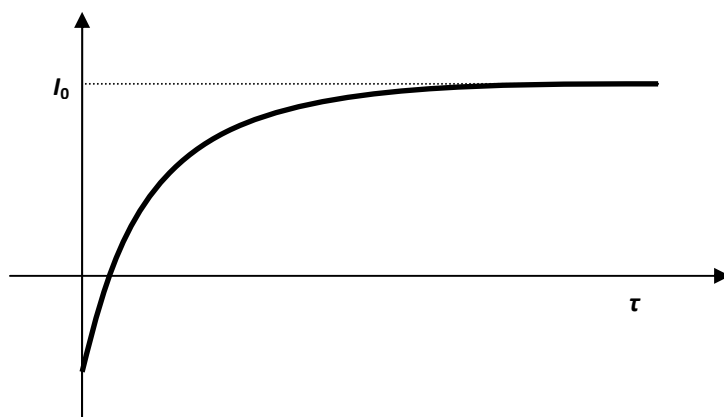
Ha a vizsgálandó minta hipotetikusán csak egyfajta kémiai eltolódású protont tartalmaz, akkor a  $B_0$  indukciójú mágneses mezőben a protonok (spinek) mágneses momentumai a mező irányához viszonyítva két féle orientációt vehetnek fel, amelyekben eltérő az energiájuk. A protonok száma a Boltzman eloszlásnak megfelelően az alacsonyabb energiájú állapotban nagyobb ( $\alpha$  protonok), és az eredő mágneses momentumának vetülete a z tengelyre azonos irányú a külső mágneses mező irányával (a  $B_0$  irányával). Így tehát az  $\alpha$  protonok mágneses momentumainak eredője a minta makroszkopikus mágnesezettsége  $M$  (9. ábra (A)). Ha a  $B_0$  mágneses mezőben lévő minta az x tengely irányából rádióhullámokat érzékel amelynek a mágneses komponensének  $B_1$  vektora a protonoknak megfelelő precessziós frekvenciával  $\omega$  forog (rezonancia feltétele) az xy síkban ( $B_0 > B_1$ ) akkor a rádióhullámok (impulzusok) alkalmazásának idejétől  $\Delta t$  függően az  $M$  vektor bizonyos szögben  $\varphi$  kitér a z tengely irányából. Ha a  $\Delta t$  elég nagy, akkor az  $M$  iránya ellentétes a  $B_0$  irányához képest, azaz a protonok többsége a magasabb energiájú állapotban van ( $\beta$  protonok), tehát  $180^\circ$ -os impulzus alkalmazása esetén a Boltzman eloszlásnak megfelelő  $\alpha$  állapotú protonok  $\beta$  állapotúvá alakulnak (inverzió) (9. ábra (B)).





9. ábra  
A relaxációs idő mérése inverziós technikával

Mivel a protonok (molekulák) mozgásuk közben ütköznek egymással (oldószer molekulákkal) ezért a  $\beta$  állapotú protonok folyamatosan energiájukat átadják környezetüknek (rács), tehát ezek szerint az  $M(-z)$  vektor intenzitása is csökken, majd pedig a  $M(+z)$  vektor intenzitása növekszik (9. ábra (B)) mindaddig még el nem éri  $180^\circ$ -os impulzus előtti intenzitását ami szintén a protonok *Boltzman* eloszlásnak felel meg. A fenti folyamatot spin – rács relaxációnak nevezik. Mivel az NMR spektrométer detektora az  $x - y$  síkban van, ezért ahhoz, hogy követni lehessen a  $180^\circ$ -os impulzus alkalmazása után az  $M(\pm z)$  időbeli változását a  $M(\pm z)$  vektort a  $180^\circ$ -os impulzus alkalmazása után bizonyos idő elteltével egy  $90^\circ$ -os impulzussal az  $x - y$  síkba hozzák (9. ábra (C)). A kapott spektrum jeleinek területe arányos a  $M(\pm z)$  intenzitásával, míg a jel orientációja az  $M(\pm z)$  vektor irányával kapcsolatos (9. ábra (D)).



10. ábra

A spin – rács relaxációs idő  $T_1$  meghatározása

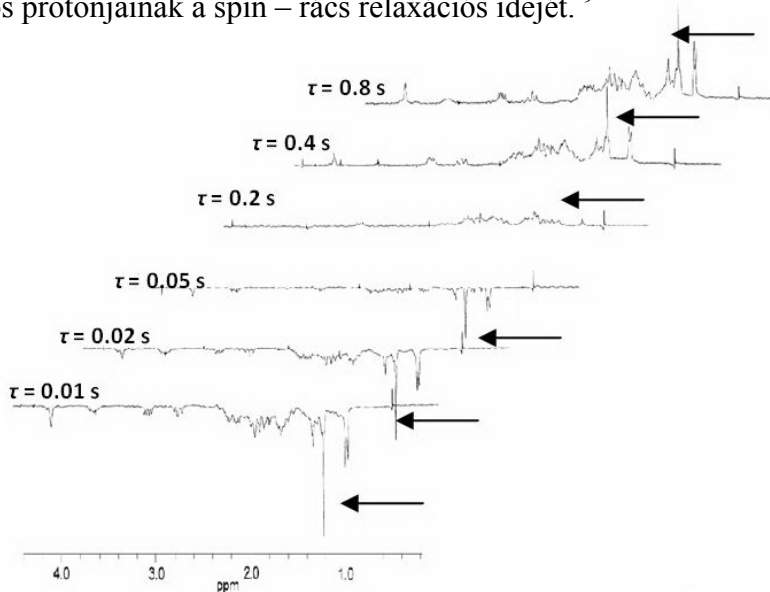
A  $180^\circ$ -os impulzus alkalmazása (inverzió) után a makroszkopikus mágnesezettség  $M$  vektora a következő függvény szerint relaxál (10. ábra):

$$M(\tau) = M_0 (1 - 2\exp[-\tau/T_1]) \quad (1),$$

ahol  $M_0$  a mágnesezettség nagysága az inverzió előtt,  $M(\tau)$  pedig az  $M$  vektor nagysága  $\tau$  idő elteltével. Mivel  $M$  arányos az NMR jelek  $I$  területének nagyságával, az (1) egyenlet felírható mint:

$$I(\tau) = I_0 (1 - 2\exp[-\tau/T_1]) \quad (2),$$

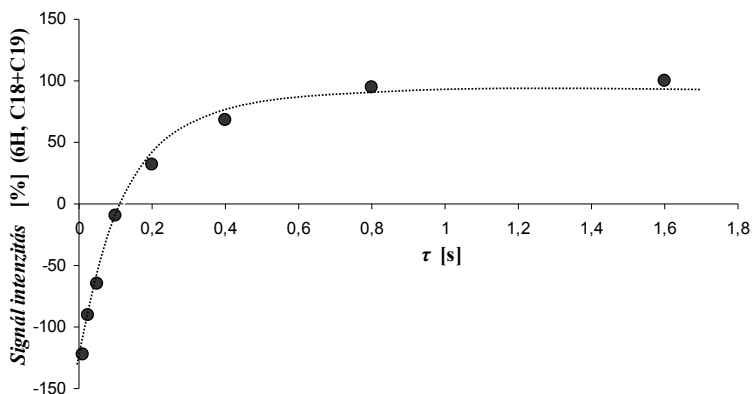
ahol  $I_0$  megfelel annak a jelnek a nagyságával amelyre igaz  $\tau > 5T_1$ . A  $T_1$  értéke fordítottan arányos a relaxáció sebességével. Ha a vizsgált molekula különböző kémiai eltolódású spin aktív magokat (pl. protonokat) tartalmaz, akkor a molekula szerkezetétől függően lehetséges, hogy a mágnesesen nem ekvivalens magoknak más – más lesz a relaxációs idejük. Hasonlóan, ha a molekulák csoportosulnak az oldatban akkor azoknak a protonoknak amelyek környezete megváltozik szintén változik a relaxációs idejük. Például a 7-oxokólsav és a 12-oxokólsav aggregációjának vizsgálatakor mindkét vizsgált epesavnál meg kell határozni a  $T_1 = f(c)$  függvényt, ahol  $c$  az epesav  $\text{Na}^+$  sójának koncentrációja. Tehát mindegyik koncentrációra meg kell határozni az epesavak bizonyos protonjainak a spin – rács relaxációs idejét.<sup>9</sup>



11. ábra

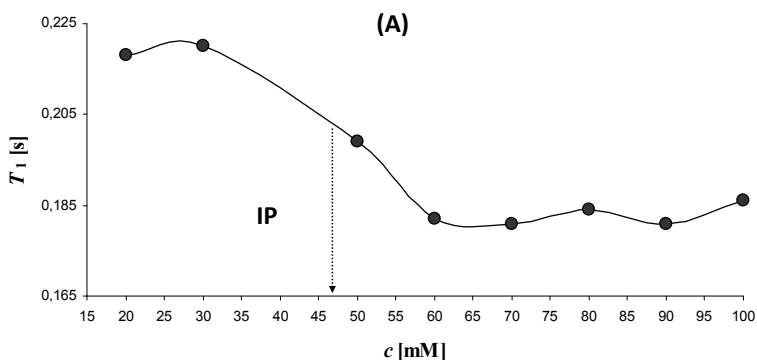
A 30 mM-os Na-12-oxokolat  $D_2O$  oldatának relaxációs idejének a meghatározása

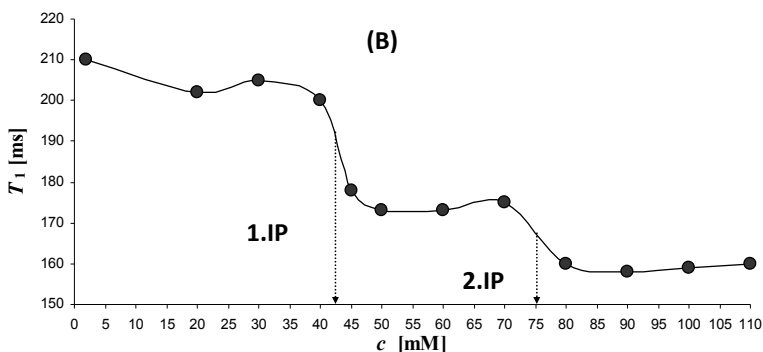
A 11-es ábra szemlélteti a Na-12-oxokolát (30 mM, D<sub>2</sub>O) C18 és C19-es (anguláris) metil csoport protonjai relaxációs idejének a meghatározását (az ábrán lévő nyíl jelöli az anguláris protonok jelét), a 12-es ábra pedig a 11-es ábra anguláris metil csoport jeleinek időbeli változását mutatja a (2) egyenlet szerint, amelynek paramétere a  $T_1$  spin – rács relaxációs idő.



12. ábra

A 6H (C18 és C19 anguláris metilcsoportok)  $T_1$  relaxációs idejének a meghatározása (30 mM-os Na-12-oxokolát D<sub>2</sub>O)





13. ábra

A  $T_1 = f(c)$  függvények, Na-12-oxokolát (A) és Na-7-oxokolát (B)

A 13-es ábrán láthatók a  $T_1 = f(c)$  függvények a Na-12-oxokolátra (A) és a Na-7-oxokolátra vonatkozóan. Az Na-12-oxokolát  $T_1 = f(c)$  függvényén egy inflexiós pont található 47 mM-nál, míg a Na-7-oxokolátnál két inflexiós pont van a 43 mM-nál és a 75 mM-nál. Mindkét epesavnál az 1.IP-hez tartozó koncentráció megfelel a primáris micella képződés KMK-nak míg a 7-oxokólsav  $\text{Na}^+$  sójánál a 2.IP-hez tartozó  $T_1$  változás jelzi a sekundáris micellák képződését. Továbbá mivel a  $T_1$  értékek az anguláris metil csoportokra vonatkoznak, az inflexiós pontok a  $T_1 = f(c)$  függvényeken bizonyítják a Small-féle aggregációt.<sup>10</sup> Végezetül a relaxációs vizsgálatok igazolták a verapamil és a 7-oxolitokólsav interakcióját.<sup>11,12</sup>

## 6. Záradék

Az epesavak keletkezéséről, jelentőségéről, hidrogén hidas aggregátumaikról, valamint az epesav aggregátumok vizsgálati módszereiről értekeztünk. Az epesav sók micelláris oldatainak fontos tulajdonsága, hogy bizonyos gyógyszer molekulákkal komplexeket alkotnak és ennek köszönhetően megváltozik a gyógyszer molekula oldhatósága, permeabilitása, eloszlása. Beszámolónk feloleli ezen a területen a legújabb NMR - relaxációs méréseink eredményeit is.

## Felhasznált irodalom:

1. M. Mikov, J.P. Fawcett (Szerk.), *Bile Acids*, Medisheet Publisher, Geneva, 2007, 178-200.
2. W. Camile (Szerk.), *The Practice of Medicinal Chemistry*, Academic Press, Oxford, 2003, 636-641.
3. A. Roda, A. F. Hofmann, K. J. Mysels, *J. Biol. Chem.* 1983, 258, 6362-6370.
4. V. Bertolasi, V. Ferretti, L. Pretto, G. Fantin, M. Fogagnolo, O. Bortolini, *Acta Crystallogr. Section B: Struct. Sci.* 2005, 61, 346-356.
5. M. Calabresi, P. Andreozzi, C. La Mesa, *Molecules* 2007, 12, 1731-1754.
6. D. M. Small, *Adv. Chem. Ser.* 1968, 84, 31- 52.
7. M. Pósa, S. Kevrešan, M. Mikov, V. Ćirin-Novta, C. Sârbu, K. Kuhajda, *Colloids Surf. B* 2007, 59, 179-183.
8. M. Pósa, S. Kevrešan, M. Mikov, V. Ćirin-Novta, K. Kuhajda, *Colloids Surf. B* 2008, 64, 151-161.
9. M. Pósa, V. Guzsvány, J. Csanádi, J. Borbás, F. Gaál, *Acta Chim. Slov.* 2009, 56(4) 807-814.
10. M. Pósa, V. Guzsvány, J. Csanádi, *Colloids Surf. B* 2009, 74, 84-90.
11. M. Pósa, S. Kevrešan, M. Mikov, V. Ćirin-Novta, K. Kuhajda, *Eur. J. of Drug. Metabolism and Pharmacokin.* 2007, 32, 109 – 117.
12. M. Pósa, V. Guzsvány, J. Csanádi, S. Kevrešan, K. Kuhajda, *Eur. J. of Pharm. Sciences* 2008, 34, 281-292.