

УДК 577.1: 615

© Коллектив авторов

ФОСФАТИДИЛХОЛИНЫ КАК ОСНОВА ИСКУССТВЕННОГО ЛЕГОЧНОГО СУРФАКТАНТА: СРАВНЕНИЕ ПОВЕРХНОСТНО- АКТИВНЫХ СВОЙСТВ

Э.М.Халилов, Т.И.Торховская, Т.С. Захарова, М.М. Кочетова, В.О. Здеинев.

НИИ физико-химической медицины МЗ РФ,
119992 Москва, М.Пироговская 1а; факс: (095) 246-48-84

Методом поверхностного баланса *in vitro* проведено сравнительное изучение поверхностно-активных свойств природных фосфатидилхолинов (ФХ) как возможной основы будущих препаратов для заместительной сурфактантной терапии. Обнаружено, что насыщенные ФХ - дипальмитоил-фосфатидилхолин (ДПЛ) и фосфолипон - обладают близкими параметрами поверхностной активности: низкими значениями равновесного поверхностного натяжения (ПН_р) и большим временем распространения по поверхности (ВРП) на границе "вода - воздух" по сравнению с ненасыщенными ФХ. Ненасыщенные яичный и соевый ФХ также обладали близкими параметрами: более высокими значениями ПН_р и меньшим ВРП. Обнаруженная связь насыщенности жирных кислот в составе фосфатидилхолинов не только с ПН_р, но также и с ВРП позволяет рассматривать оба этих критерия как информативные для оценки поверхностной активности при выборе компонентов искусственного сурфактанта. Близость изученных параметров у ДПЛ и фосфолипона дает основания продолжить испытания последнего с целью возможности замены ДПЛ фосфолипоном в составе искусственных сурфактант-замещающих препаратов.

Ключевые слова: поверхностное натяжение, сурфактант, фосфатидилхолин, дипальмитоиллецитин

ВВЕДЕНИЕ. Известно, что натуральный легочный сурфактант (СФ), являясь комбинацией липидов и апопротеинов, предотвращает слипание альвеол при выдохе (образование ателектазов), в основе чего лежат три основных механизма [1]: СФ легко адсорбируется на поверхности слоя жидкости, выстилающей альвеолы, снижает поверхностное натяжение (ПН) этого слоя во время выдоха до очень низких значений и быстро распространяется по поверхности альвеол во время вдоха. Основным липидным компонентом лёгочного СФ, ответственным за снижение ПН в альвеолах, является дипальмитоилфосфатидилхолин (дипальмитоиллецитин, ДПЛ) [2]. Этот насыщенный фосфатидилхолин (ФХ) обладает устойчивостью к окислению и определенными поверхностно-активными свойствами, которые позволяют ему в сочетании со специфическими белками обеспечивать выполнение функций натурального СФ [3].

Дефицит СФ при тяжелых легочных патологиях (респираторном дистресс-синдроме) компенсируют путем СФ-заместительной терапии [4]. Существуют два вида СФ-замещающих препаратов: на основе натурального сырья и искусственные

ФОСФАТИДИЛХОЛИНЫ - ОСНОВА ИСКУССТВЕННОГО СУРФАКТАНТА

безбелковые препараты на основе синтетического ДПЛ [5,6]. В России недавно появился первый СФ-замещающий препарат на основе натурального сырья - гомогената ткани легких крупного рогатого скота [7], аналогов же искусственным безбелковым СФ пока нет. Применяемые сегодня зарубежные искусственные безбелковые СФ-замещающие препараты - ALEC (Pumactant, Britannia Pharmaceuticals, Redhill, Surrey, UK) и Exosurf (Burroughs Wellcome, Research Triangle Park, NC, USA) - содержат в качестве основы дефицитное сырье, синтетический ДПЛ [8], высокая стоимость синтеза которого в основном и определяет цены на эти препараты. В России синтетический ДПЛ не производится.

В поиске новых безбелковых СФ-замещающих препаратов путь копирования природных соединений является не единственным. Fujiwara и Robertson [8] полагают, что поскольку миссией экзогенного СФ является образование пленки липида, подобной ДПЛ, то это может быть достигнуто также посредством биофизических механизмов и факторов распространения, отличающихся от действующих *in vivo*. Так, в экзосурфе присутствие гексадеканола облегчает повторное распространение и адсорбцию ДПЛ на поверхности слоя жидкости, выстилающего альвеолы, во время вдоха [1]. Среди параметров, используемых *in vitro* для оценки поверхностных свойств сурфактантных пленок, используют параметры поверхностной адсорбции, поверхностного распространения, величину ПН_р, оценивают способность пленки СФ к сжатию и изменению ПН в течение цикла сжатия [9-11].

С целью создания более доступных композиций искусственных СФ-препаратов в настоящей работе проведено сравнительное исследование некоторых информативных критериев поверхностной активности ФХ как основы СФ. При этом изучалось влияние степени ненасыщенности жирных кислот в составе ФХ на параметры поверхностной активности в плане возможной замены синтетического ДПЛ на другие виды природных ФХ.

МЕТОДИКА. В работе использовали хроматографически чистые яичный ФХ (Харьковский завод бактериальных препаратов), соевый ФХ ("Nattermann"), ДПЛ ("Sigma"), фосфолипид (Rhone-Poulenc Rorer).

ПН измеряли методом Вильгельми (поверхностного баланса) с использованием платиновой пластины на цифровом тензиометре К 10ST (Kruss GmbH, Германия) при 37°C. Аликвоту липидов в 2-5 мкл смеси хлороформ : этанол = 9:1 с концентрацией 2,28 мг/мл осторожно наслаивали на поверхность физиологического раствора в круглом контейнере с диаметром 4,4 см и регистрировали динамику изменения ПН в течение 30 сек [4].

Равновесное ПН (ПН_р) определяли как постоянную, минимально достижимую величину ПН в мН/м [7,8]. Скорость снижения ПН выражали в мН/м/сек.

Для каждого типа липида фиксировали время распространения по поверхности (ВРП), то есть время от момента нанесения липида на поверхность солевой гипофазы (сек) в течение которого процесс снижения ПН завершался и достигалось значение ПН_р.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Для оценки ПН_р использовали оптимальную поверхностную концентрацию ФХ, которую определяли с использованием яичного ФХ при трех концентрациях: 0,30 мкг/см², 0,45 мкг/см² и 0,75 мкг/см². Как видно из рисунка 1, исходная величина ПН физиологического раствора при 37°C составляла 70 мН/м, что соответствовало данным других авторов [4,8]. Нанесение ФХ на поверхность водного солевого раствора в первые секунды резко снижает ПН. При этом, начиная с 0,45 мкг/см², дальнейшее увеличение концентрации ФХ уже не влияет на величину ПН. Достигается постоянное, минимальное значение ПН_р, равное 25 мН/м, которое свидетельствует о том, что монослой насыщен и возможный избыток липида не оказывает влияния на уже достигнутую величину ПН_р. Повидимому, этим можно объяснить

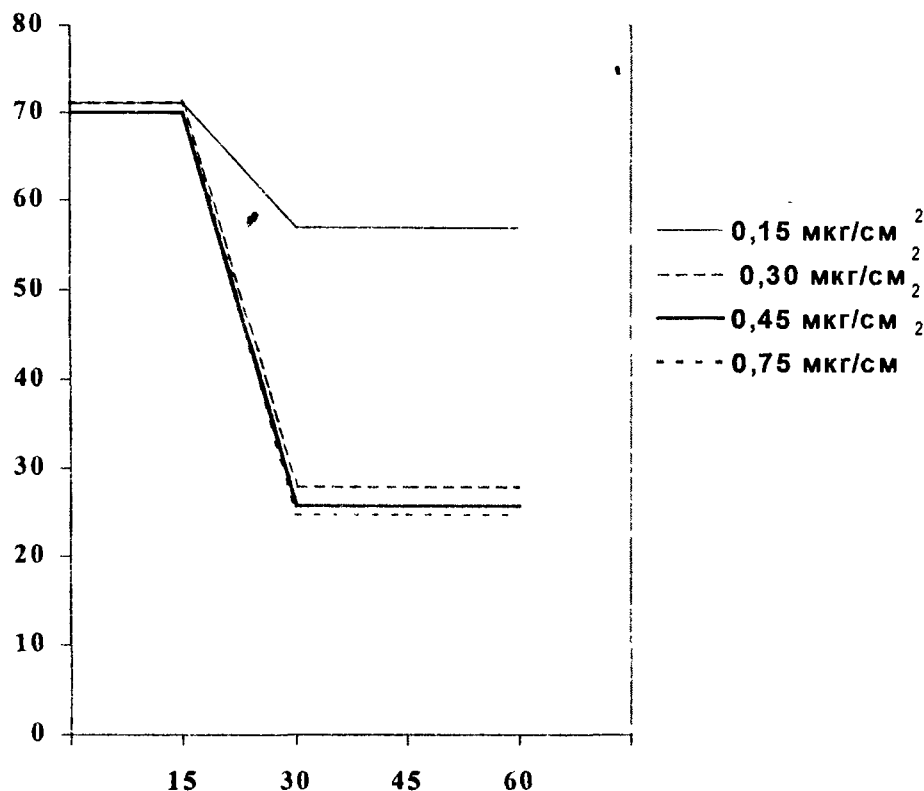


Рисунок 1.

Влияние концентрации яичного фосфатидилхолина на величину равновесного поверхностного натяжения ЯФХ вносили в 2-5 мкл хлороформ-этанольной смеси, наслаивая на поверхность солевой гипофазы при 37° С. Момент добавки отмечен стрелкой. По оси абсцисс - время (сек). По оси ординат - ПН (мН/м)

использование избыточного количества липида в некоторых исследованиях - до 12,6 мкг/см² [12], хотя для формирования плотного монослоя молекул ДПЛ достаточно 0,3 мкг/см² [4]. В дальнейшем концентрация 0,45 мкг/см², достаточная для достижения ПН_р у яичного ФХ, использовалась при исследовании ПН_р различных ФХ (табл.).

Таблица. Величина равновесного поверхностного натяжения (ПН) для различных типов фосфатидилхолина

	Яичный ФХ	Соевый ФХ	ДПЛ	Фосфолипон
ПМ (мН/м)	25,2 ± 0,18	26,6 ± 0,18	21,7 ± 0,34	21,4 ± 0,32
Количество опытов	n=7	n=7	n=6	n=6

Примечание: Липиды вносили в 3 мкл хлороформ-этанольной смеси (9:1), наслаивая её на поверхность солевой гипофазы (физиологического раствора) при 37°С. Концентрация ФХ на поверхности гипофазы - 0,45 мкг/см²

Как видно из таблицы, самые низкие величины ПН_р (21 мН/м) имеют ДПЛ и фосфолипон, что может указывать на их приблизительно одинаковую эффективность в качестве компонентов СФ-препарата. Величины ПН_р для яичного и соевого ФХ достоверно выше, но близки к верхнему пределу (~ до 25 мН/м). Эта величина, согласно данным Fujiwara с соавт. [8], соответствует физически обусловленным пределам значений ПН_р для несжатого монослоя сурфактанта, способного обеспечивать нормальное функционирование альвеол.

ФОСФАТИДИЛХОЛИНЫ - ОСНОВА ИСКУССТВЕННОГО СУРФАКТАНТА

При смешивании растворов ДПЛ (ПН_p 21,7 мН/м) и яичного ФХ (ПН_p 25,2 мН/м) одной концентрации в различных соотношениях (1 : 4; 4 : 1 и др.) получали пропорциональное изменение параметра ПН_p в зависимости от их содержания в смеси. То есть равновесное ПН смеси реагирует даже на невысокое содержание примеси другого ФХ и эффекта "экранирования" не наблюдается (рис.2).

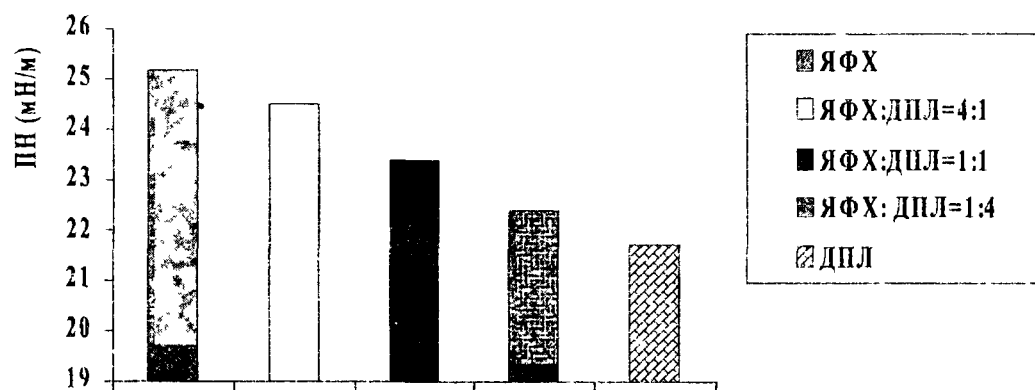


Рисунок 2.

Равновесное поверхностное натяжение дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПЛ), яичного (ФХ) и их смесей. Смесей готовили смешиванием исходных растворов ДПЛ и яичного ФХ. По оси ординат - ПН (мН/м)

Молекула ДПЛ теоретически является наиболее эффективной формой для снижения поверхностного натяжения. Полярная группа ДПЛ в интерфазе связана с жидкой фазой, неполярная - направлена к воздуху. Существует предположение, что вследствие наличия идентичных насыщенных прямых остатков пальмитата молекулы ДПЛ могут быть особо плотно упакованы на границе раздела вода-воздух, наиболее эффективно предотвращая контакт между водой и воздухом, тем самым способствуя снижению ПН на границе раздела [2]. Это становится особенно выраженным при сжатии поверхности с липидным монослоем. В случае яичного ФХ присутствуют ненасыщенные жирные кислоты с "перекрученными" из-за наличия двойных связей цепями, что затрудняет плотную упаковку таких гидрофобных "хвостов" на границе раздела. По-видимому, вследствие этого генерируются различия в ПН_p между насыщенными и ненасыщенными ФХ. То есть насыщенные ФХ, такие как ДПЛ, в принципе являются наиболее приемлемой формой для достижения минимального ПН .

Полученные данные показали, что ДПЛ и фосфолипид идентичны в отношении одного из основных параметров проявления поверхностной активности - ПН_p .

Необходимо отметить, что в литературе нет единого критерия, характеризующего процесс распространения СФ на границе "воздух-вода". Обычно используется термин "величина скорости распространения по поверхности" [13]. При этом иногда имеется в виду непосредственно величина ПН через определенный промежуток времени после нанесения СФ на поверхность физиологического раствора [12,13]; иногда время между нанесением образца на поверхность и моментом, когда ПН снижается до уровня, лишь ненамного не достигшего ПН_p (выше на 2 мН/м) [4]. Учитывая неоднозначность этих параметров, с разных сторон характеризующих процесс распространения СФ, мы исследовали независимо как скорость снижения ПН после нанесения липида на поверхность солевой гипофазы, так и время, в течение которого процесс снижения ПН завершался - ВРП. На рисунке 3 представлена типичная кривая изменения ПН , полученная для фосфолипидов. После добавления фосфолипидов ПН снижалось в течение 16 секунд (ВРП) с постоянной скоростью 3 мН/м в секунду до момента достижения ПН_p , которое для фосфолипидов составляет 21,4 мН/м.

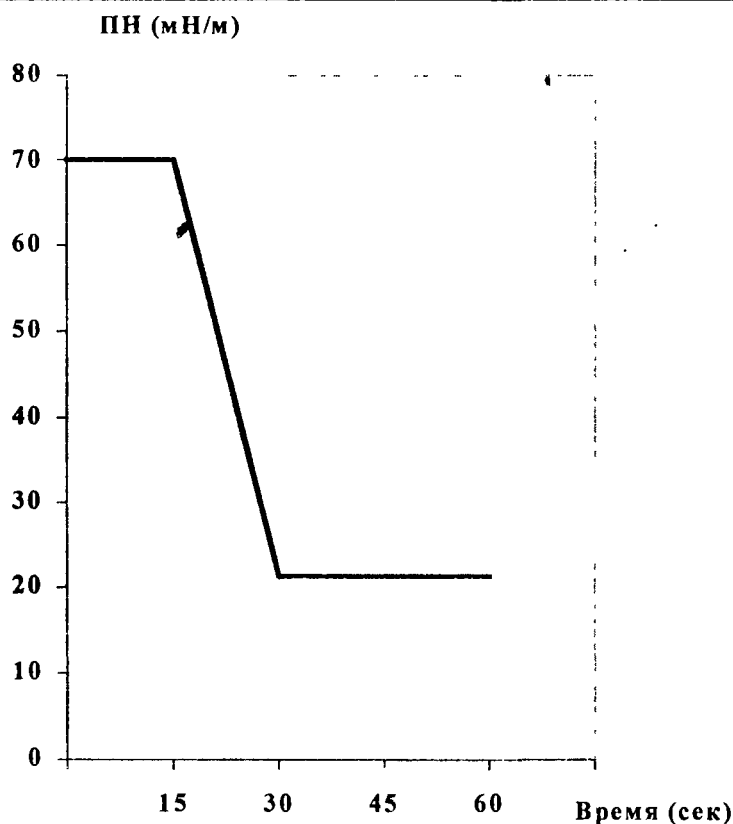


Рисунок 3.

Общий вид кривой снижения поверхностного натяжения фосфолипона. Момент добавки фосфолипона отмечен стрелкой. Двусторонней стрелкой отмечено время, за которое завершился процесс снижения ПН - ВРП (время распространения по поверхности). Наклон графика отражает скорость снижения ПН (3 мН/м /сек). Равновесное ПН - 21,4 мН/м. По оси абсцисс - ВРЕМЯ (сек) По оси ординат - ПН (мН/м)

Сравнительное исследование этих параметров у насыщенных и ненасыщенных ФХ показало, что такая скорость снижения ПН - 3 мН/м/сек - является величиной одинаковой и постоянной для всех испытанных образцов (рис. 4). То есть, этот параметр оказался не чувствительным к ненасыщенности жирных кислот в составе ФХ.

В отличие от скорости снижения ПН, ВРП было различным для испытанных липидов (рис. 4). Самым коротким (14 сек) оно оказалось у яичного ФХ и соевого ФХ, а самым длительным (16 сек) - у ДПЛ и фосфолипона. Последние при этом имели самые низкие величины Π_p (21,7 мН/м и 21,4 мН/м соответственно, табл.).

Полученный результат согласуется с предположением, что ДПЛ, имеющий в своем составе только насыщенные жирные кислоты, имеет температуру основного фазового перехода (гель-жидкий кристалл) 41°C [14] и является "твердым" при 37°C, что должно затруднять его быстрое распространение по поверхности [15]. По этой причине первые попытки использовать в качестве СФ чистый ДПЛ потерпели неудачу - его использовали без распространяющего агента. Фосфолипон, имеющий в своем составе только насыщенные жирные кислоты - стеариновую и пальмитиновую и температуру основного фазового перехода 51°C, обладал тем же временем распространения, что и ДПЛ. В отличие ДПЛ и фосфолипона яичный ФХ, который имеет в своем составе ненасыщенные ЖК и вследствие этого имеет более низкую температуру фазового перехода (-7°C - -15°C), находится при 37°C в "жидком" состоянии [14]. Функции ФХ, содержащих

ФОСФАТИДИЛХОЛИНЫ - ОСНОВА ИСКУССТВЕННОГО СУРФАКТАНТА

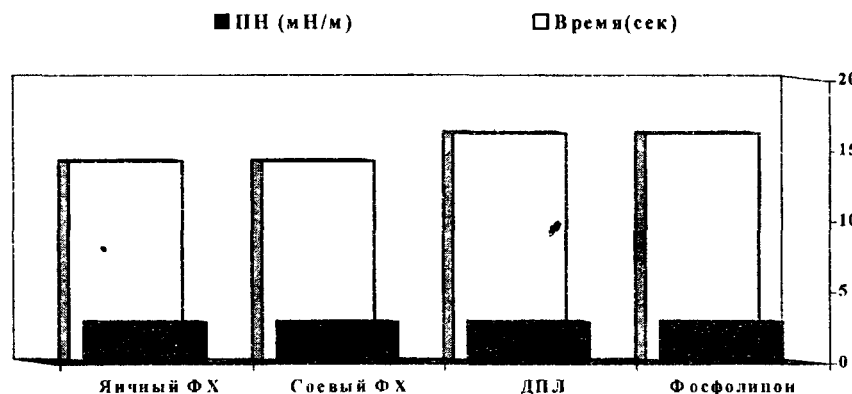


Рисунок 4.

Время распространения по поверхности и скорость снижения поверхностного натяжения для различных типов фосфатидилхолина. Время распространения по поверхности и скорость снижения ПН для различных типов ФХ измерялась при нанесении аликвоты липида на поверхность солевой гипофазы (см. рис.3). Скорость, с которой понижалось ПН, была величиной постоянной для всех испытанных типов ФХ и составляла 3 мН/м/сек. По оси ординат (1) - Скорость снижения ПН (мН/м/сек). (2) - Время распространения (сек)

остатки жирных кислот с одной или двумя двойными связями, заметные количества которых присутствуют в природном СФ не известны, но одним из предположений является то, что их присутствие в смеси снижает температуру фазового перехода и способствует быстрому распространению ДПЛ в интерфазе воздух-вода [2,15].

Обнаруженная связь насыщенности жирных кислот в составе фосфатидилхолинов как с ПН, так и с ВРП позволяет использовать оба этих критерия для сравнения поверхностно-активных свойств ФХ при выборе фосфолипидной основы искусственного СФ. Близость изученных параметров у ДПЛ и фосфолипона дает основание продолжить испытания последнего с целью его возможного использования для замены ДПЛ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Московского комитета по науке и технологиям, проект № ГА-99/01.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гребенников В.А., Миленин О.Б., Рюмина И.И. (1995) Респираторный дистресс-синдром у новорожденных. М., с.108-109.
2. Akino T. (1992) In Pulmonary surfactant. - Robertson B., Van Golde L.M.G., Batenburg J.J. (Eds.).- Elsevier - Amsterdam-Lond. -N.Y.-Tokyo, pp.19-31.
3. Creuwels L.A.J.M., van Golde L.M.G., Haagsman H.P. (1997). Lung. **175**, 1-39.
4. Sun B. (1993). Experimental studies of neonatal surfactant dysfunction and surfactant therapy in meconium aspiration syndrome. - Stockholm, pp.8-23
5. Corcoran J.D., Berggren P., Sun B., Halliday H.L., Robertson B., Curstedt T. (1994) Arch. Dis. Child., **71**, 165-169.
6. Halliday H.L. (1996) Drugs, **51**, 226-237
7. Розенберг О.А., Данилов Л.Н., Волчков В.А. и др. (1998) Бюл. exper. биол. мед., **126**, 455- 458.
8. Fujiwara T., Robertson B. (1992) In: Pulmonary surfactant (Robertson B., Van Golde L.M.G., Batenburg J.J., Eds.), - Elsevier - Amsterdam-Lond. -N.Y.-Tokyo, pp.561-592.

9. Benerjee R., Puniyani R.R., Bellare J.R. (2000) J. Biomater. Appl., **15**, 140-159.
10. Benerjee R., Bellare J.R. (2001) J. Appl. Physiol., **90**, 1447-1454.
11. Benerjee R., Bellare J.R. (2001) Pulm.Pharmacol.Ther., **14**, 85-91
12. Takahashi A., Nemoto T., Fujiwara T. (1994) Acta Paediatr. Jpn., **36**, 613-618.
13. Tanaka J., Takei T., Aiba T. (1986) J. Lipid Res. **27**, 475-485.
14. Марголис Л.Б., Бергельсон Л.Д. (1986) Липосомы и их взаимодействие с клетками, М., Наука, с.8-10.
15. Morley C.J. (1992) In: Pulmonary surfactant (Robertson B., Van Golde L.M.G., Batenburg J.J. Eds.), Elsevier, Amsterdam-Lond. -N.Y.-Tokyo, pp.605-610.

Поступила 14.02.2002.

PHOSPHATIDYLCHOLINES AS A BASIS OF ARTIFICIAL LUNG SURFACTANT: COMPARISON OF SURFACE-ACTIVE PROPERTIES.

E.M. Khalilov, T.I. Torkhovskaya, T.S. Zakharova, M.M.Kochetova, V.O.Zdeshnev

Research Institute of Physico-Chemical Medicine, M.Pirogovskaya 1a, Moscow, 119992, Russia;
tel./fax: (095)246-48-84.

The Wilhelmy balance was used for *in vitro* testing of surface active properties of natural phosphatidylcholines (PCs) as possible basis for surfactant replacement therapy. Saturated PC, dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and phospholipon (PL) had similar parameters of surface activity: minimal values of equilibrium surface tension (EST) and the longest surface spreading time (SST). Unsaturated egg and soybean PCs also shared similar values of surface activity parameters (EST and SST). Correlation between fatty acid saturation of PCs and EST or SST allows to consider both these parameters as informative ones for surface tension evaluation in the search of components for artificial surfactant. Since parameters of DPPC and PL surface activity are equivalent in their performance, they may be potentially employed for testing instead of DPPC as a possible base for artificial surfactant.

Key words: surface tension, surfactant, phosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylcholine