

## Оценка функционирования сурфактанта легких с позиций микромеханики липидного монослоя<sup>1</sup>

*На підставі аналізу ізотерм стиску ліпідних моношарів і термодинамічної оцінки шаруватих систем запропоновано пояснення деяких боків механізму роботи легеневого сурфактанта. Коли хімічний потенціал моношару при стиску досягає значення хімічного потенціалу вільного від механічних діянь рідинного біслою мембрани, в субфазі починається перехід ліпіда з моношарової фази у бішарову за рахунок створення бішарових складок. При збільшенні площі поверхні альвеол в умовах вдиху складки розгортаються. Таким чином, при нормальному диханні процес має квазізворотний характер. При форсованому диханні можуть відбуватися, з одного боку, певні втрати сурфактанту в субфазі за рахунок змикання складок, які прагнуть знизити енергію крайки, в агрегати типу бішарових бульбочок, з другого боку, крайка є місцем нестабільності, де може відбуватися злиття ліпідних агрегатів з крайкою та збагачення таким шляхом моношару ліпідного компоненту. Висловлено припущення, що для лікування синдрому дихальної недостатності новонароджених необхідно шукати способи збагачення моношару ліпідами з боку субфази або методи інгаляції ліпідної суспензії, яка має морфологію інвертованих фаз.*

### Введение

Легочный сурфактант — комплексная липидпротеиновая система, которая может быть описана на основе принципов физики жидких кристаллов [16, 18]. В этой системе объемные слоистые структуры находятся в равновесии с монослоем, располагающимся на поверхности альвеол в виде мономолекулярной пленки Ленгмюра [13]. Подобные системы широко используются в биофизике при моделировании мембранных структур [8], эволюционной биохимии для воссоздания предбиологических комплексов и изучения их свойств [5], а также технике в области молекулярного зодчества (микроэлектронике) при конструировании элементов нанокомпьютеров [1].

Глубокое понимание физических и физиологических характеристик мономолекулярных слоев легочного сурфактанта и его объемных структур на основе изучения свойства пленок Ленгмюра и слоистых жидкокристаллических систем открывает новые горизонты в познании микромеханики функционирования альвеол и стимулирует усилия в поисках синтетических аналогов сурфактанта, предназначенных для лечения синдрома дыхательной недостаточности (СДН) новорожденных, от которой только в США умирает более 10 000 младенцев ежегодно [11].

Легочный сурфактант состоит, главным образом, из липидов (более 90 %), которые представлены дипальмитоиллецитином — ДПЛ ( $\approx 80$  %) и фосфатидилглицерином — ФГ ( $\approx 10$  %), а также небольшим количеством холестерина, жирных кислот и триглицеридов [13, 16, 18].

Основное назначение легочного сурфактанта — понижение в альвеолах поверхностного натяжения (ПН) до весьма низких значений (12 мН/м), что предотвращает их спадение даже при форсированном

<sup>1</sup> Работа доложена на I Всесоюзном совещании по лиотропным жидким кристаллам (Иваново, 11—13 декабря, 1990 г.).

уменьшении объема легких<sup>2</sup>. ДПЛ способен уменьшить ПН практически до 0, но он не может спонтанно растекаться по альвеолярной поверхности при физиологических значениях температуры ( $t_c$  ДПЛ около  $41^\circ\text{C}$ ). ФГ способен спонтанно растекаться по поверхности ( $t_c$  значительно меньше  $0^\circ\text{C}$ ), но не может снижать ПН до достаточно низких значений.

Чтобы теоретически разрешить поставленную природой дилемму, предложена так называемая концепция «преимущественного выжимания» [6, 12], согласно которой ФГ как жидкий компонент выжимается первым из монослоя в субфазу, а монослой, становясь обогащенным ДПЛ, понижает ПН до низких значений при нарастающем сжатии.

В соответствии с этой концепцией субфаза во время выдоха при сокращении дыхательной поверхности должна обогащаться преимущественно жидким компонентом. При фазе вдоха этот компонент соответственно и должен встраиваться в растягивающийся монослой. Но поскольку встраивание липидов непосредственно в монослой из субфазы весьма ограничено в силу наличия в альвеолярной жидкости тубулярного миелина и других замкнутых гидратированных липидных структур (типа мультит- и бислойных пузырьков — липосом), крайне неохотно создающих монослой, то авторы упомянутых работ [6, 12] предположили существование в альвеолярном пространстве резерва так называемого «сухого» сурфактанта представленного многослойными системами с незамкнутыми краями (типа термотропных смектических жидких кристаллов). Тщательный морфологический анализ ламеллярных телец легких, однако, выполненный недавно [16, 18], позволил обнаружить лишь замкнутые слоистые липидные структуры. Более того, проведенная на модельных системах проверка теории «преимущественного выжимания» не подтвердила селективного обогащения субфазы жидким липидным компонентом по сравнению с твердым [17].

Здесь предлагается объяснение некоторых сторон механизма работы легочного сурфактанта на основе анализа изотерм сжатия монослоев липидов различного фазового состояния и термодинамической оценки образования бислойных систем.

## Методика

Материалы, а также методы регистрации изотерм сжатия липидных монослоев и изучения их коллапса представлены в соответствующих литературных источниках [2, 3], а подробный термодинамический анализ образования бислойных складок при сжатии жидкого липидного монослоя изложен в работе Горюнова [3]. Некоторые данные, полученные другими авторами [7, 13], для сопоставления представлены в едином масштабе так, что 100 %-ной площади монослоя сурфактанта соответствуют монослой ДПЛ, ФГ или их смеси, в которых при 100 %-ной площади поверхности кюветы приходилось по  $200 \text{ \AA}^2$  на молекулу липида. Сравниваемые монослои исследовали при температуре  $32\text{--}37^\circ\text{C}$ , а скорость их сжатия находилась в интервале  $15\text{--}20 \%$  начальной площади кюветы в минуту.

## Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлены изотермы сжатия ДПЛ, ФГ, их смеси и изотерма легочного сурфактанта, унифицированные по масштабу на основании результатов ранее проведенных исследований [2, 3, 7, 13]. Как видно из сравнения кривых, для изотермы смеси липидов и изотермы сурфактанта характерны плоское плато ( $a-b$ ) и существенно более низкие значения ПН по сравнению с ФГ при одинаковой мере сжатия мо-

<sup>2</sup> Другая функция сурфактанта — предотвращать потерю воды за счет ее испарения с легочной поверхности и осуществлять тем самым также регуляцию температурного баланса организма.

нослой. Это плато соответствует области максимального давления (минимального ПН) монослоя жидкого компонента при минимальной площади, приходящейся на молекулу. Как было показано нами ранее [2, 3], при пережатии жидкого монослоя возможно формирование погружающихся в субфазу вертикальных складок, образующихся за счет перехода монослоя липидов в бислой (рис. 2). Это обусловлено особенностями термодинамики тонких слоев и связано со следующей ситуацией.

Сжатие монослоя, сопровождающееся увеличением поверхностной плотности липида, естественным образом приводит к увеличению химического потенциала  $\mu$  липидного компонента монослоя [3]:

$$-d\mu = SdT + Ad\gamma.$$

В этом уравнении  $S$  и  $A$  — площадь и энтропия соответственно, приходящиеся на молекулу липидного компонента в монослой;  $\gamma$  — ПН,  $T$  — абсолютная температура поверхности, на которой находится липидная

пленка. Когда химический потенциал монослоя достигает значения химического потенциала свободной от механических воздействий жидкой бислойной мембраны, начинается переход липида из монослойной фазы в бислойную т. е. происходит образование

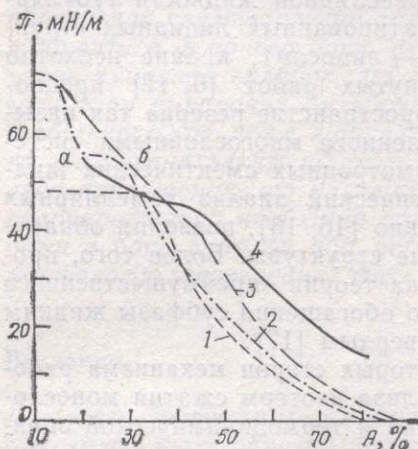


Рис. 1. Зависимость поверхностного давления монослоев ( $\pi$ , мН/м) от их площади ( $S$ ) при температуре 35 °С и скорости сжатия 15 % площади кюветы в минуту: 1 — фосфатидил-глицерин (ФГ); 2 — смесь ФГ с дипальмитоиллецитином (ФГ:ДПЛ=3:7); 3 — ДПЛ; 4 — сурфактант. Для липидов при 100 %-ной площади поверхности кюветы приходилось по 200 Å<sup>2</sup>/мол;  $\pi$ =72—ПН.

направленных в субфазу бислойных складок (см. рис. 2). Образование таких складок не нарушает контакта хорошо растворимых полярных (гидрофильных) головок липидных молекул с водой. В то же время складки позволяют уменьшить свободную поверхность (значит, и поверхностную энергию) углеводородной части жидкого липидного монослоя, имеющей около 25 мДж/м<sup>2</sup> ПН<sup>3</sup>. Складки, направленные в противоположную от субфазы сторону, подобными преимуществами не обладают и, таким образом, не являются энергетически выгодными.

При существенном пережатии и увеличении вертикальных размеров складок стремящаяся к минимуму энергия кромки будет приводить к схлопыванию складок в бислойные пузырьки (подробнее об этом см. обзоры [10, 14]), необратимо уходящие в субфазу. При небольшом пережатии, однако, когда рост складок ограничен незначительным изменением площади поверхности и объемом жидкой фазы в монослое, эволюция складок при чередующихся изменениях площади монослоя при дыхании может являться обратимым процессом. В этом случае при увеличении поверхности монослоя жидкая фаза будет вновь переходить в монослойное состояние, разворачивая бислойные складки. Тогда последовательность событий, изображенных на рис. 2, будет обратной, начиная с фазы (в).

Образованием бислойных складок из монослоя на поверхности жидкости можно объяснить наблюдавшийся другими авторами факт удвоения (по сравнению с рассчитанным для монослоя) радиоактивности меченого липида, нанесенного на воду и затем максимально сжатого [9]. Вместо складчатого монослоя, однако, в работе Gerschleld [9] вы-

<sup>3</sup> ПН может быть выражено альтернативно в энергетических единицах.

сказывается предположение о формировании на поверхности раздела плоского бислоя липидных молекул, что не укладывается в рамки существующих в настоящее время взглядов на физико-химию амфифильных поверхностей. Более того, образование складок с последующим возможным их замыканием в бислойные пузырьки при достижении критического размера складок хорошо согласуется с современной концепцией образования бислойных везикул в водных системах липидов [10].

Предлагаемый нами механизм объясняет наличие замечательных свойств легочного сурфактанта быстро растекаться по поверхности во время фазы вдоха. При обосновании такого свойства сурфактанта

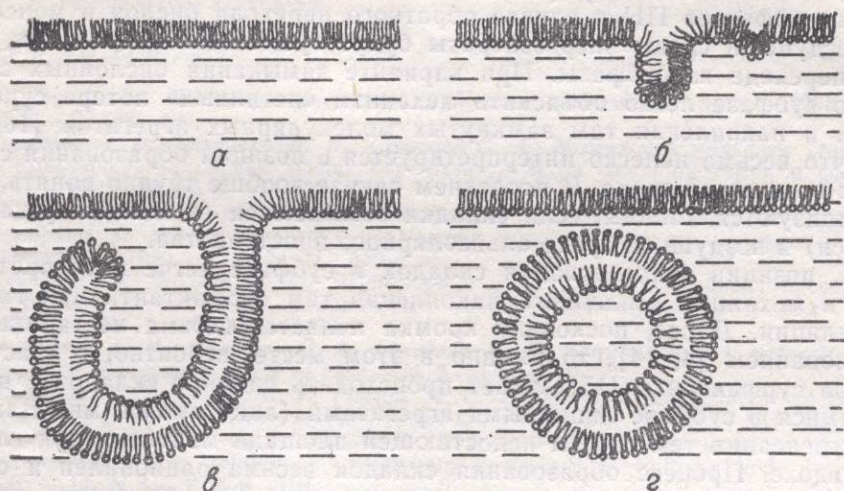


Рис. 2. Схема последовательных стадий образования бислойных складок при сжатии поверхности липидного монослоя: а — максимально сжатый, но еще не деформированный монослой; б — образование бислойных складок при дальнейшем сжатии монослоя; в — увеличение размеров складок при дальнейшем сжатии монослоя; г — необратимое замыкание складок в бислойные пузырьки минимального радиуса.

нет необходимости вводить гипотезу о наличии резерва «сухой» его формы в альвеолярном пространстве. Поскольку нативный сурфактант на фазовой диаграмме трехмерной системы ФГ/ДПЛ соответствует зоне частичной эвтектики [7], то и в монослое в начальный период сжатия при выдавливании эвтектической формы молекулы ДПЛ и ФГ могут выходить в субфазу одновременно в соотношениях, близких к эвтектическим. Это объясняет данные, представленные другими авторами о совместных потерях из монослоя молекул обоих типов [17]. При дальнейшем сокращении поверхности монослоя и выходе в складки все большей части эвтектической фазы, система все более «отвердевает» и, наконец, по достижении левого края первого плато изотерма устремляется вверх (к низким ПН), достигая второго плато, завершающегося коллапсом твердого компонента и формированием трехмерной фазы. Рассмотренный нами механизм работы сурфактанта легких основывается, главным образом, на приведенном выше большом числе косвенных доказательств.

Данные двух наблюдений могут быть истолкованы как прямые свидетельства его работы при дыхании [17]. Во-первых, это данные сравнительной оценки пстери липидов из монослоя при сжатии по накоплению радиоактивных липидов в субфазе и по сокращению площади монослоя. По радионуклидной оценке выход оказывается в 1,5—4 раза меньшим, что говорит о локализации части «потерянных» липидов у поверхности раздела, а не в глубине субфазы. Во-вторых, это обнаруженные вертикальные складки на электронно-микроскопических картинах монослоя, оттененного платиной, приготовленного при ПН первого плато (23 мН/м). Авторы, однако, интерпретировали электронно-

микроскопические результаты как доказательство схлопывания монослоя в бислой не в сторону субфазы, а в воздушное пространство альвеол. Подобное объяснение кажется нам маловероятным по следующим соображениям физического и физиологического характера. Вряд ли по оттененным электронным микрофотографиям можно обнаружить различия между двумя направлениями образования складок. Ведь любые неровности имеют молекулярные размеры, а оттенение смазывает детали. Энергетически процесс будет выигрышным, если свободная гидрофобная поверхность монослоя будет сокращаться. А это возможно, если бислой образуется в субфазе. Взаимодействие полярных групп гораздо сильнее, чем гидрофобных хвостов липидов. Следовательно, при работе эффектов ПН в случае обратного перехода бислоя в монослой из воздушной среды энергозатраты будут существенно большими, чем при переходе из субфазы. При варианте замыкания бислойных складок в субфазе легко объяснить механизм «истинных» потерь сурфактанта и накопления там замкнутых молекулярных агрегатов [10, 16, 18], что весьма нелегко интерпретируется с позиций образования складок в воздушной среде. В последнем случае вообще трудно понять, как реутилизуются липиды, если складки замыкаются (а липиды накапливаются) в воздушной среде альвеолярного пространства.

С позиций формирования складок в субфазе легче интерпретировать и механизм усиленного накопления там сурфактанта при гипервентиляции. Далее, поскольку кромка является весьма нестабильным образованием [4, 14], то именно в этом месте, вероятно, с участием белков сурфактанта [15] может происходить слияние складок с находящимися в субфазе липидными агрегатами (липосомами, мицеллами) и компенсация тем самым недостающей площади монослоя при глубоком вдохе. Процесс образования складок весьма рационален и с некоторых других позиций физиологии дыхания. Так, по оценке «избыточной» радиоактивности сжатого монослоя [9, 17] компенсаторные резервы поверхности альвеол за счет разворачивания складок монослоя могут достигать 2—4-х кратного ее увеличения.

Следует указать также, что концепция образования складок в субфазе, а не в воздушной среде, объясняет недостаточную эффективность применения водной суспензии липосом для лечения СДН [11]. Действительно, пузырьки практически неспособны встраиваться в монослой сурфактанта со стороны воздушной среды из-за энергетической невыгодности контакта гидрофобных хвостов липидов монослоя с гидрофильной поверхностью липидных везикул. Для целей лечения СДН необходимо искать способы подвода к монослою недостающих липидов из субфазы. Возможно, окажется эффективным также эндотрахеальное введение липидной суспензии, имеющей морфологию инвертированных фаз. Но эти соображения требуют специальной проверки в эксперименте. Дальнейшего экспериментального подтверждения требует и сам механизм образования складок в пережатом монослое. Но здесь исследователи ждут те же трудности, что и в обосновании механизмов возникновения замкнутых бислойных агрегатов липидных молекул в воде, поскольку плоские бислойные промежуточные структуры, каковыми можно считать и складки, являются метастабильными и короткоживущими [10].

*S. A. Seleznev, A. V. Goryunov, L. Z. Tel'*

#### AN APPRAISAL OF LUNG SURFACTANT FUNCTIONING IN TERMS OF LIPID MONOLAYER MICROMECHANICS

The analysis of compression isotherms of lipid monolayers and thermodynamical estimation of the conditions of the formation of layered systems underlies the explanation of some details of lung surfactant work. When the chemical potential of the monolayer during compression reaches the value of the chemical potential of the liquid bilayer membrane free of the mechanical stress, the conversion of monolayer into bilayer phase commences by means of squeezing out of monolayer in subphase creating bilayer

ripples. During inspiration when alveolar surface expands, ripples turn back. Hence, in the course of normal breathing the process is quasi-reversible. During forced breathing definite losses of surfactant in the subphase can occur due to closing of ripples tending to minimize the edge energy. On the other hand, the edge is the place of instability of bilayer where fusing of lipid aggregates with edge takes place enriching thus monolayer by the lipid molecules. It is suggested that the treatment of newborn respiratory distress syndrome necessitates the new ways of the enrichment of a monolayer with lipids from the subphase or the ways for inhalation of lipidic suspension having the morphology of the inverted phases.

Medical Institute, Ministry of Public  
Health of Kazakhstan, Tselinograd

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блинов Л. М. Ленгмюровские пленки // Успехи физических наук. — 1988. — 155, № 3. — С. 443—480.
2. Горюнов А. В., Энгбрехт И. И., Селезнев С. А. Возможный механизм генерации протомембран на ранних этапах биогенеза // Журн. эвол. биохимии и физиологии. — 1982. — 18, № 5. — С. 450—456.
3. Горюнов А. В. Получение термодинамических характеристик бислойной липидной мембраны на основе измерения параметров монослоя при его коллапсе // Биол. мембраны. — 1990. — 7, № 5. — С. 549—555.
4. Лейкин С. Р., Козлов М. М., Черномордик и др. Слияние мембран: преодоление гидратационного барьера и локальные перестройки структуры // Там же. — 1986. — 3, № 11. — С. 1159—1171.
5. Михайлов А. И., Селезнев С. А., Шведова М. К. Биомембраны у истоков жизни на земле // Наука в СССР. — 1989. — № 3. — С. 41—45.
6. Bangham A. D., Morley C. J., Phillips M. C. The physical properties of an effective lung surfactant // Biochim. et biophys. acta. — 1979. — 573, N 4. — P. 552—556.
7. De Fontanges A., Bonte F., Taupin C., Ober R. Pressure-area curves of phospholipid monolayers in relation of pulmonary surfactant // Colloids and surfaces. — 1985. — 14, N 4. — P. 309—316.
8. Ganes G. L. Insoluble monolayers at lipid-gas interfaces. — N.-Y.: Intersci, 1966. — 208 p.
9. Gerschfeld N. R. Phospholipid surface bilayer at the air — water interface. III. Relation between surface bilayer formation and lipid bilayer assembly in cell membranes // Biophys. J. — 1986. — 50, N 3. — P. 457—461.
10. Lasic D. D. The mechanism of vesicle formation // Biochem. J. — 1988. — 256, N 1. — P. 1—11.
11. Marx J. L. Liposomes: research application grow // Science. — 1978. — 199, N 4352. — P. 1056—1057.
12. Morley C. J., Bangham A. D., Johnson P. et al. Physical and physiological properties of dry lung surfactant. // Nature. — 1978. — 271, N 5641. — P. 162—163.
13. Munden J. W., Swarbrick J. Time-dependent surface behavior dipalmitoyllecithin and lung alveolar surfactant monolayers // Biochim. et biophys. acta. — 1973. — 291, N 3. — P. 344—350.
14. Petrov A. G., Seleznev S. A., Derzhanski A. Principles and methods of liquid crystal physics applied to the structure and function of biological membranes // Acta physica polonica. — 1979. — A55, N 3. — P. 385—405.
15. Shiffer K., Howgood S., Duzgunez N., Goerke J. Interaction of low molecular weight group of surfactant — associated proteins (SP5—18) with pulmonary surfactant // Biochemistry. — 1988. — 27, N 8. — P. 2689—2695.
16. Stratton C. J., Zasadzinski J. A. N., Elkins D. Lung lamellar body amphiphilic topography: A morphological evaluation using the continuum theory of liquid crystals: 1. Closed surfaces: Closed spheres, concentric tori and Dupin cyclides // Anat. Rec. — 1988. — 221, N 4. — P. 503—519.
17. Van Liempd J. P. J. G., Boonman A. A. H., Demel R. A. et al. Nonselective squeeze-out of dioleoylphosphatidylcholine and dioleoylphosphatidylglycerol from binary mixed monolayers with dipalmitoylphosphatidylcholine // Biochim. et biophys. acta. — 1978. — 897, N 4. — P. 495—501.
18. Zasadzinski J. A. N., Stratton C. J., Rudolph R. Lung lamellar body amphiphilic topography: A morphological evaluation using the continuum theory of liquid crystals: 2. Dislocations, edge disclinations and irregular defects // Anat. Rec. — 1988. — 221, N 4. — 520—532.

Целиноград. мед. ин-т  
М-ва здравоохранения РФ

Материал поступил  
в редакцию 09.04.91