

Инактивация на терапевтични алвеоларни сърфактанти от лизофосфатидилхолин

Свободан Александров¹, Румен Тодоров², Здравко Лалчев³,
Дочи Ексерова²

¹Медицински университет – София,
Катедра Медицинска физика и биофизика

²Институт по физикохимия, Българска академия на науките

³СУ „Св. Климент Охридски“, Биологически факултет

Резюме. Лизофосфолипидите привличат интереса на изследователите във връзка с функционирането на биологичните мембрани, а присъствието им в малки количества в алвеолите на белия дроб вероятно има отношение към инактивацията на алвеоларния сърфактант. В настоящата работа са изследвани пенни филми от два терапевтични сърфактантни препарата – Curosurf и Infasurf, като са получени данни за вероятността за образуването им и стабилността на филмите в присъствие на лизофосфатидилхолин (LysoPC) при физиологична концентрация на NaCl (0,15 mol/dm³).

1 Въведение

Алвеоларният сърфактант (АС) е липопротеинов комплекс, покриващ въздушно/водната фазова граница в алвеолите на белия дроб. Основната му функция е да намалява и регулира повърхностното напрежение в процеса на дишане и да предотвратява алвеоларния колапс [1]. Недостигът на количеството на АС или отклонения в оптималния му биохимичен състав предизвикват нарушения в нормалната респираторна дейност. Най-сериозното нарушение е респираторният дистрес синдром (РДС), който при недоносени новородени е в голяма степен причина за високата детска смъртност при раждане [2] и води до тежки респираторни проблеми при възрастни пациенти. Причините за развитие на заболяването не са напълно изяснени, но се приема, че агенти, като плазмени протеини, лизо- и ненаситени фосфолипиди, свободни мастни киселини и др., предизвикват инхибиране на повърхностната активност на АС.

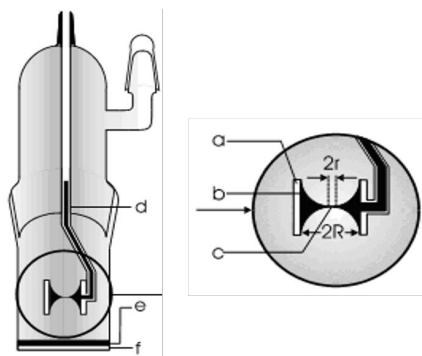
Терапевтичните алвеоларни сърфактанти се прилагат за компенсиране на недостига на ендогенен АС. Според източника си на получаване те се делят на естествени и синтетични. Естествените сърфак-

тантни препарати се получават от животински бели дробове чрез екстракция с органични разтворители. Към тази група спадат Infasurf (от телешки бял дроб) и Curosurf (от свински бял дроб).

2 Материали и методи

Методът на пенните филми е доказал своята адекватност при проучване на повърхностната активност на АС в норма и патология, при условия максимално близки до тези в алвеолите на белия дроб. [3]

В стъклената клетка на Шелудко-Ексерова (Фиг. 1) пенният филм с радиус $0,1 \text{ nm}$ се образува при изтегляне на течност в стъклената капилляра от цилиндърчето с радиус $R = 2 \text{ mm}$, в което е двойновдълбнатата капка. Филмът се образува при капиллярно налягане $P = 2\sigma/R$, където σ е повърхностното напрежение на разтвора. При спонтанно изтъняване на филма оцветяването му се променя в зависимост от дебелината на водната прослойка между двете повърхности.



Фиг. 1: Схема на клетката за измерване на микроскопичните пенни филми: **a** – цилиндърче (държач на филма); **b** – двойновдълбната капка; **c** – микроскопичен пенен филм; **d** – стъклена капилляра; **e** – сърфактантен разтвор; **f** – оптически плоско стъкло.

При около $30\text{--}40 \text{ nm}$ той изглежда сив, а при дебелина по-малка от 20 nm се вижда като черен диск (Фиг. 2). Преходът от равновесни сиви до черни филми става посредством спонтанното образуване и нарастване на черни петна в площта на филма (процес който се наблюдава в зрителното поле на микроскопа). Черните филми са два типа - обикновени (CBF) и Нютонови (NBF).

При изследваните филми с терапевтични сърфактантни препарати в присъствие на LysoPC се наблюдават само CBF. Стабилността на пенните филми се определя експериментално чрез изследване

Инактивация на терапевтични алвеоларни сърфактанти от...



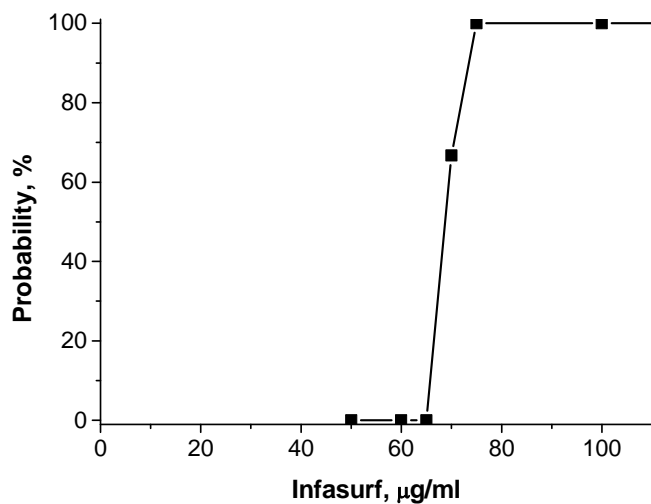
Фиг. 2: Етапи в изтъняването на пенните филми до обикновени черни (CBF).

на зависимостта на вероятността за образуване на стабилен черен филм от концентрацията (W/C). Вероятността за образуване на стабилен филм се определя като съотношение на броя на случаите, когато се получава стабилен черен филм към общия брой формирани пенни филми. Когато при изтъняване филмите се късат преди достигане дебелината на черен филм, т.е. в сила е $W = 0\%$, концентрацията на сърфактанта се означава като C_s . В обратния случай концентрацията, при която изтъняването води до стабилни черни филми, които никога не се късат, се означава като C_t [4].

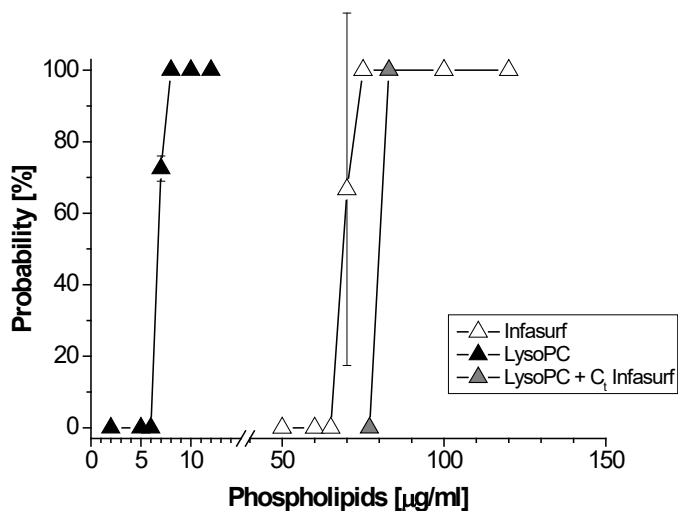
Curosurf е натурален терапевтичен сърфактантен препарат – екстракт от свински бял дроб, получен чрез колонна хроматография. Съдържа 70% фосфатидилхолин, 30% фосфатидилглицерол, 1% специфични сърфактантни белтъци (SP-B и SP-C). Infasurf (Calfactant – ONY Pharmaceuticals, Amherst, NY) е екстракт от естествен сърфактант от телешки бял дроб, включващ липиди и специфичните сърфактантни протеини (SP-B и SP-C). Изследваните сърфактантни концентрации са изчислени от тоталното липидно съдържание в Infasurf. За приготвянето на работните разтвори е използвана дестилирана вода ($1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), концентрацията на NaCl (Merck) е $0,15 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (обработен при 500°C). LysoPC е взет от Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) и е използван без допълнително пречистване. Времето на изчакване е 30 минути, а работната температура е 22°C .

3 Резултати

При изследването на двата сърфактантни терапевтични препарата и смесването им с лизофосфатидилхолин е приложен различен подход. При работата с Infasurf е определена концентрацията за образуване на стабилни филми (C_t), след което са направени измервания с вариращи концентрации на LysoPC. На Фиг. 3 и 4 са показани резултатите от изследването на стабилността на пенните филми от чист Infasurf и при смесването му с LysoPC. За чистия Infasurf бе намерено, че $C_t = 75 \mu\text{g}/\text{ml}$. За LysoPC определената стойност на C_t е $8 \mu\text{g}/\text{ml}$, докато $C_s = 3 \mu\text{g}/\text{ml}$. При добавянето на LysoPC с концентрация под C_s ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) към разтвор на Infasurf ($C_t = 75 \mu\text{g}/\text{ml}$) бе отчетена дестабилизация на образуването на черни филми ($W = 0\%$). Ефектът

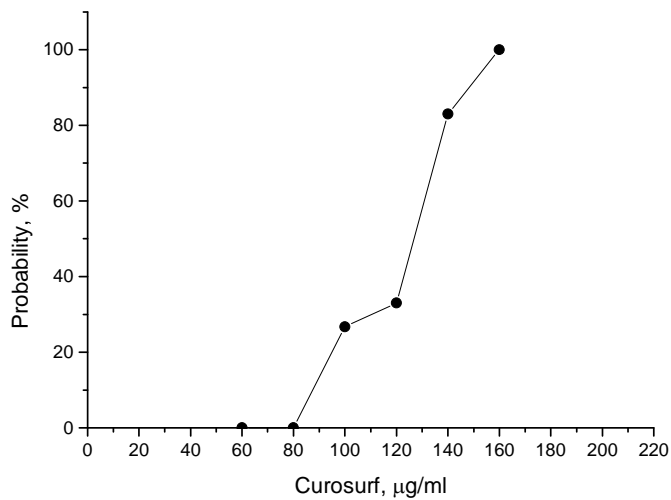


Фиг. 3: Зависимост на вероятността за образуване на черни филми от концентрацията на Infasurf. Измерванията са проведени на 30 min в присъствие на 0.15 M NaCl при $T = 22^{\circ}\text{C}$.

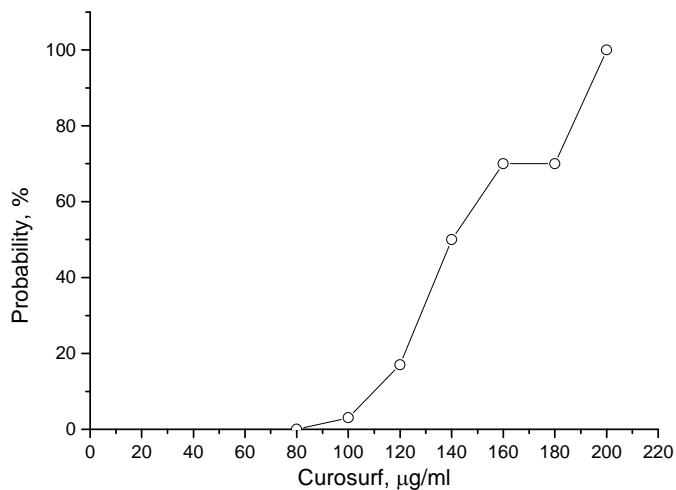


Фиг. 4: Зависимост на вероятността за образуване на черен филм от чист LysoPC и негови смеси с Infasurf от концентрацията на LysoPC. Измерванията са проведени на 30 min в присъствие на 0.15 M NaCl при $T = 22^{\circ}\text{C}$.

Инактивация на терапевтични алвеоларни сърфактанти от...



Фиг. 5: Зависимост на вероятността за образуване на черни филми от концентрацията на Curosurf. Измерванията са проведени на 30 min в присъствие на 0.15 M NaCl при $T = 22^{\circ}\text{C}$.



Фиг. 6: Зависимост на вероятността за образуване на черен филм от смеси на LysoPC ($3 \mu\text{g/ml}$) с Curosurf от концентрацията на Curosurf. Измерванията са проведени на 30 min в присъствие на 0.15 M NaCl при $T = 22^{\circ}\text{C}$.

на дестабилизация се наблюдава при концентрации на лизолипида в границите между 2 и 8 $\mu\text{g/ml}$. При концентрации на LysoPC над 8 $\mu\text{g/ml}$ се наблюдава образуването на стабилни черни пенни филми, вероятно поради формирането на смесени адсорбционни слоеве.

При работата с Curosurf бе приложен обратният подход – на база определената вече стойност на C_s за LysoPC бяха смесвани различни концентрации на терапевтичния препарат при C_s на лизолипида. На Фиг. 5 е показано образуването на черни филми на чистия сърфактантен препарат Curosurf. Вижда се, че $C_t = 160 \mu\text{g/ml}$ ($W = 100\%$). При смесването на Curosurf с LysoPC (3 $\mu\text{g/ml}$) на 30 минута, показано на Фиг. 6, кривата на вероятността за образуване на 100% черни филми (W/C) показва отместване на C_t на смесения филм към висока концентрация на терапевтичния сърфактант.

4 Заключение

Моделът на тънкия течен филм и зависимостта на вероятността за образуване на стабилен черен филм от концентрацията (W/C) дават възможност да се получат резултати в подкрепа на тезата за инактивиращото действие на лизолипидите върху екзогенните терапевтични сърфактанти. Изследванията и при двата сърфактантни препарата на смесените филми с лизолипиди показват дестабилизиращия ефект на LysoPC. Намерено е, че дестабилизацията е налице при концентрация на лизолипида (C_s), при която $W = 0\%$. При достигане LysoPC до концентрация C_t , дестабилизиращият ефект не се наблюдава.

Литература

- [1] R. Peleman, M. Engle (1981) *Lung*. **159**, pp. 53-59.
- [2] M. Avery, J. Mead (1959) *Am. J. Dis. Child.*, **97**, pp. 518-523.
- [3] З. Лалчев, Е. Христова (2010) *Алвеоларен сърфактант и неонатален дистрес синдром*, pp. 48-50.
- [4] D. Exerowa (2002) *Adv. Coll. Int. Sci.* **96**, pp. 75-100.