

УДК 576:532.59

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИЗУЧЕНИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ СВОЙСТВ ЛИПИДНЫХ МОНОСЛОЕВ – МОДЕЛЕЙ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

К. Д. Казаринов¹, А. С. Титов², В. С. Малинин¹, С. В. Титов¹

¹ Фрязинский филиал Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова
РАН, 141120, Московская область, Фрязино, пл. академика Введенского, 1

² Московский физико-технический институт (ГУ),
141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9

Статья поступила в редакцию 12 февраля 2019 г.

Аннотация. В данной статье представлены результаты экспериментальной работы по развитию метода изучения поверхностных свойств липидных монослоев. Метод основан на регистрации длины волны и затухания поверхностных акустических волн, что позволяет определять как поверхностное натяжение, так и поверхностную вязкость монослоя. Капиллярная волна выступает в качестве измерительного зонда для определения свойств монослоев. Измерения на монослоях L- α -лецитина показывают, что разработанный метод является эффективным инструментом для исследования поверхностных свойств липидных монослоев в условиях микроволнового облучения. Этот подход позволяет исследовать характерные особенности структуры и функционирования биомембран при различных патологических состояниях, тем самым предоставляя дополнительную возможность для своевременного получения диагностических данных и облегчая выявление многих заболеваний на ранних стадиях развития.

Ключевые слова: метод генерации капиллярных волн, поверхностные свойства липидных монослоев, легочный сурфактант, модели биологических мембран, длина волны и затухание поверхностных волн, микроволновое облучение.

Abstract. Experimental work on a novel method for the study of the surface properties of lipid monolayers is reported, based on recording the wavelength and

attenuation of surface acoustic waves so permitting the determination of both the surface tension and surface viscosity of a monolayer. The capillary wave acts as a measuring probe for determining monolayer properties. Measurements on L- α -lecithin monolayers indicate that the acoustic wave method is an effective tool for investigating surface properties of lipid monolayers exposed to microwaves. Knowledge of the surface properties of lipid monolayers also allows the determination of their energetic and mechanical parameters and also the area of single molecules bounding a monolayer. These parameters are important for understanding the structure and function of lipid bilayers in biological entities allowing investigation of both the characteristic features of the structure and the functioning of biomembranes under various pathological conditions thereby yielding an additional option for rapidly obtaining diagnostic data so facilitating the identification of many diseases in their early stages. Capillary wave recording has been used in a series of experiments and preliminary results of these indicate a decrease in the surface tension of the sample by an average of 5% over the entire range of lipid concentrations.

Key words: capillary wave generation method, surface properties of lipid monolayers, pulmonary surfactant, models of biological membranes, wavelength and attenuation of surface waves, microwave irradiation.

1. Введение

Воздействие электромагнитных полей на окружающую среду растет из года в год. Причем, увеличивается не только интенсивность электромагнитного фона, но и меняются характеристики электромагнитных сигналов. Даже если средний уровень фона электромагнитного излучения (ЭМИ) на значительной территории невелик, то локальные и временные характеристики могут отличаться на порядки величин. В частности, это касается персонала, обслуживающего оборудование систем связи, медицинские приборы, локационные станции, а также системы безопасности в общественных местах. С другой стороны, известен положительный терапевтический эффект при использовании ЭМИ и разрабатываются все новые и новые методы лечения различных заболеваний [1-

3]. Воздействия ЭМИ на клетки человека, по мнению авторов работы [4], могут вызывать программируемую смерть клеток (апоптоз), модификацию дифференциации клеток, адаптивную реакцию клеток, изменение процессов пролиферации и другие важные биологические процессы.

Механизмы, с помощью которых электромагнитные волны диапазона крайне высоких частот (КВЧ) способны вызывать системные эффекты во всем организме при локальных воздействиях, где проникновение осуществляется на небольшую глубину, до сих пор недостаточно изучены. Эта ситуация таит в себе, с одной стороны, нераскрытые возможности КВЧ терапии, а с другой – возможную опасность для здоровья людей использования данного вида излучения.

При исследовании клеток большое значение имеет качественное и количественное определение липидов биообъекта. Современная липидомика причисляет липиды к основным молекулам жизни благодаря тому, что они служат конструктивной основой клеточных мембран, выполняя разграничительную и регуляторную функции, а также участвуют в переносе управляющих сигналов рецепторов клетки.

Проведенный литературный обзор результатов исследований биологического действия ЭМИ от низкочастотного, микроволнового, а также видимого диапазона дает основание предположить, что одним из наиболее чувствительных элементов клетки к действию ЭМИ являются клеточные мембраны [5]. Предлагаемая работа посвящена изучению метода исследования монослоев липидов – моделей биологических мембран с целью изучения биологического действия микроволн.

Изучение свойств тонких пленок поверхностно-активных веществ на границе вода-воздух актуально для понимания целого ряда процессов в области физической химии, коллоидной химии, гидродинамики, биологии и т.д. Особое место в этом ряду занимает изучение липидных монослоев как моделей биологических мембран, а также легочных сурфактантов.

Данный метод изучения липидных монослоев позволяет определять как

энергетические и механические параметры монослоя так и площадь единичных молекул, выстилающих монослой, что важно для понимания структуры и функции липидных бислоев в биологических объектах. Знание поверхностных свойств легочных сурфактантов необходимо и для фундаментальных исследований и для диагностики нарушений сурфактантной системы человека.

2. Экспериментальная установка

Для реализации метода измерения свойств липидных монослоев на поверхности воды с помощью электрострикционной генерации капиллярных волн была разработана следующая установка (рис. 1).



Рис. 1. Схема установки для изучения свойств липидных монослоев на поверхности воды. Пояснения к рисунку даны в тексте статьи.

В качестве генератора волн использован цилиндрический электрод диаметром 1 мм расположенный параллельно поверхности воды. Зазор между электродом и водой составлял 1 мм. В качестве генератора напряжения, подаваемого на электрод, использовали ЦАП MacLab ID Instruments и усилитель с дополнительной фильтрацией сигнала. Генератор позволял получать переменное напряжение амплитудой до 2 кВ в полосе частот от 1 Гц до 500 Гц. Форма сигнала генератора задавалась в соответствие с уравнением

$$\varphi(t) = \varphi_0(t) \sqrt{(1 - \cos 2\pi t / T)(1 - \cos \omega t)}, \quad (1)$$

где φ_0 - амплитуда максимального размаха, T - длительность кадра (256 мс), ω - циклическая частота сигнала ($2\pi \cdot 100 \text{ с}^{-1}$). Такая форма позволяет использовать кратковременную генерацию гармонического сигнала без значительного искажения частотного спектра. Длительность генерации в одном кадре составляет 256 мс, что позволяет исключить регистрацию волн отраженных от краев сосуда.

Как указывалось ранее [6], плотность сил, действующих на жидкость, пропорциональна квадрату потенциала электрода φ :

$$p_e(x,t) \sim \varphi^2 = p_0(x)(1 - \cos 2\pi t / T)(1 - \cos \omega t), \quad (2)$$

Кроме того, эффективность генерации капиллярных волн существенно зависит от частоты, так что вклад гармоника $2\pi/T$ по сравнению с основной частотой можно считать незначительной. Таким образом, выбранная схема генерации позволяет получать пакеты поверхностных волн, описываемых уравнением [7]

$$\zeta(x,t) = \zeta_0 \left[1 - \cos \left(\frac{2\pi}{T} \left(\frac{kx + \alpha}{\omega} - t \right) \right) \right] \cos(kx + \alpha - \omega t) e^{-\gamma x}, \quad (3)$$

при $kx/\omega < t < kx/\omega + T$, и $\zeta(x) = 0$ при $t < kx/\omega$ и $t > kx/\omega + T$. Здесь α - сдвиг фазы относительно функции изменения потенциала генератора, а задержка $kx/\omega + \alpha$ соответствует времени достижения поверхностных волн частоты ω от генератора до источника.

Распространение капиллярных волн регистрировали с помощью оптических датчиков 1 и 2, расположенных на расстоянии 20 и 40 мм от генератора, соответственно. Искривление поверхности воды над датчиком от горизонтального положения приводит к изменению светового потока, отраженного от поверхности, причем при условии малости амплитуды волн по сравнению с длиной волны, сигнал с датчика с достаточной точностью является гармонической функцией от фазы капиллярной волны. Тогда для сигнала от i -го датчика имеем:

$$I_i(t) = I_0 \left[1 - \cos \left(\frac{2\pi}{T} \left(\frac{kx_i + \alpha}{\omega} - t \right) \right) \right] \cos(kx_i + \alpha - \omega t) e^{-\gamma x_i}, \quad (4)$$

Здесь в фазу сигнала α вносит добавку также система индикации и усиления сигнала. Важно, однако, что величина α одинакова для обеих датчиков и поэтому может быть исключена. В упрощенном виде можно записать:

$$I_1(t) = \alpha_0 \left[1 - \cos \left(\frac{2\pi}{\omega T} (\vartheta - \omega t) \right) \right] \cos(\vartheta - \omega t), \quad (5)$$

$$I_2(t) = \alpha_0 \left[1 - \cos\left(\frac{2\pi}{\omega T}(kL + \vartheta - \omega t)\right) \right] \cos(kL + \vartheta - \omega t) e^{-\gamma L}, \quad (6)$$

где L - расстояние между датчиками, $\vartheta = kx_1 + \alpha$, $\alpha_0 = I_0 e^{-\gamma x_1}$.

Пример сигнала от оптических датчиков при генерации поверхностных волн на чистой воде при 25 °С представлен на рис. 2. Для уменьшения шумов, вызванных акустическими помехами сигнал накапливали 16 раз, синхронизируя кадры относительно начала генерации. Аппроксимируя эти кривые функциями (5), находим неизвестные параметры α_0 , ϑ , k , γ . При этом отношение максимальных амплитуд $I_2 / I_1 = e^{-\gamma x_1}$ определяет коэффициент затухания, а абсолютный сдвиг фаз между двумя сигналами - волновой вектор k . Далее с помощью соотношений работы [7] вычисляются натяжение σ , и сжимаемость монослоя ε . Необходимые вычисления были реализованы с помощью программного обеспечения Chart, Scope и Igor Pro в рамках комплекса MacLab ID Instruments.

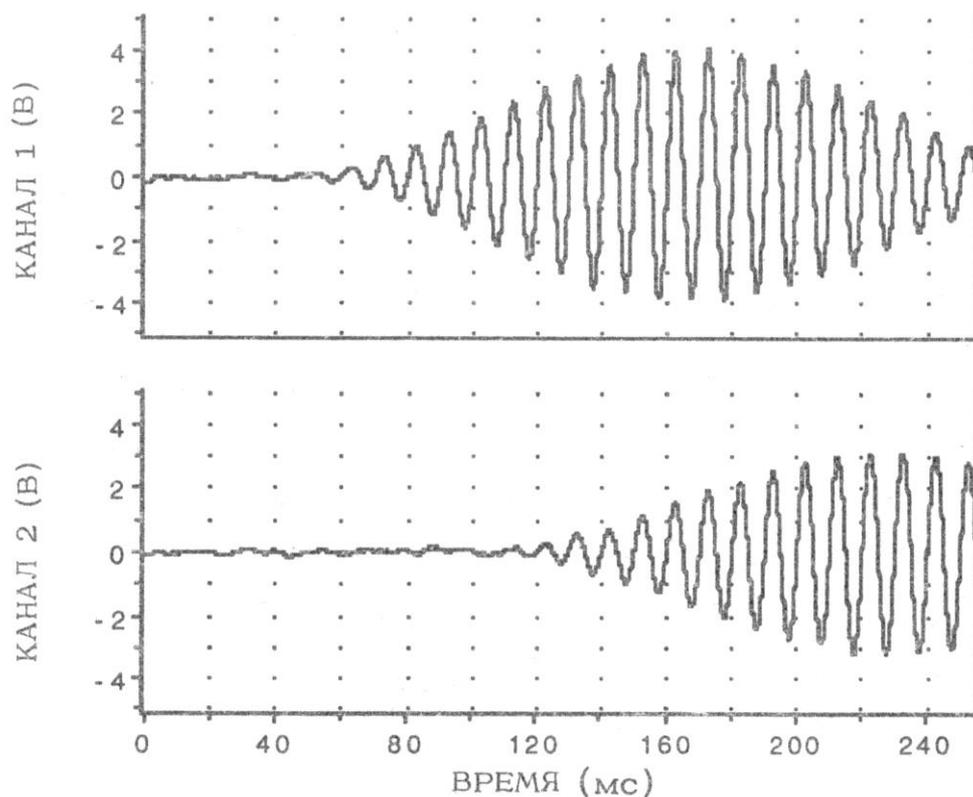


Рис. 2. Типичная запись регистрации поверхностных волн оптическими датчиками. Частота генерации - 100 Гц. Расстояние между датчиками - 20 мм. Представлен результат усреднения 16 кадров.

3. Измерение поверхностных свойств монослоя лецитина

Раствор L- α -фосфатидилхолина (лецитина) 1 мг/мл в растворе гексан/этанол (9/1) наносили дробными порциями по 1 мкл на поверхность раствора NaCl 100 мМ. После каждой порции ожидали 1 минуту для испарения растворителя и проводили измерения. Результаты представлены на рис. 3.

Как можно видеть, поверхностное натяжение при формировании плотного монослоя снижается до ~ 25 мН/м. При этом поверхностная концентрация лецитина достигает значения около 2 молекул/нм², что соответствует площади на одну молекулу 0.5 нм².

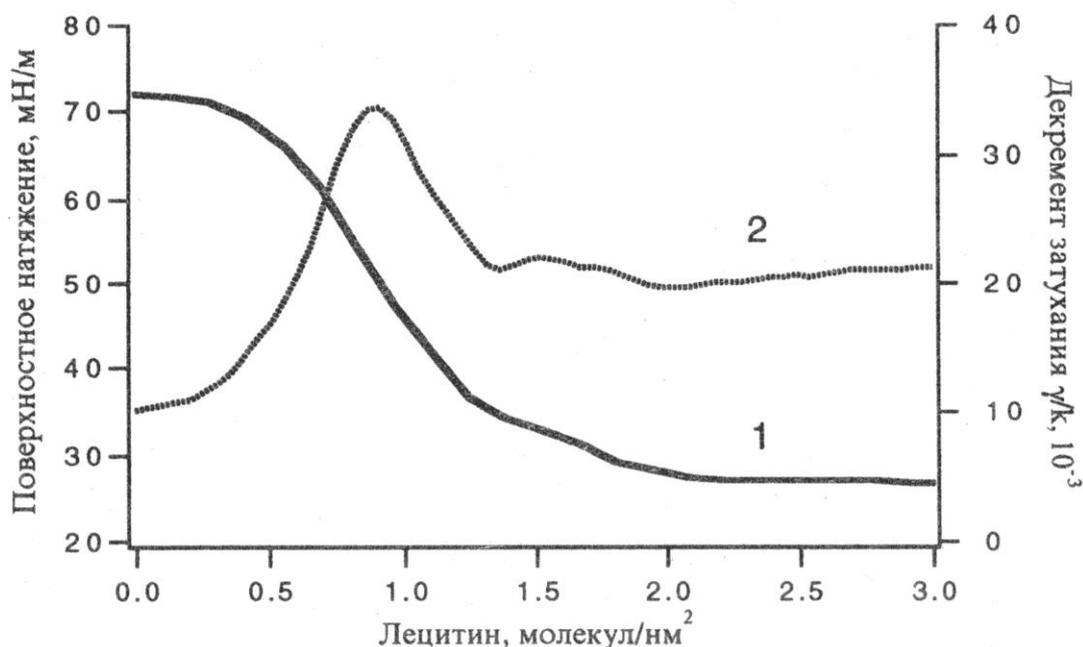


Рис. 3. Диаграммы σ -Г и δ -Г. Концентрация лецитина представлена в количестве молекул на нм². Температура раствора 25° С. Кривая 1 представляет поверхностное натяжение, кривая 2 - декремент затухания поверхностных волн.

Эти результаты хорошо соответствуют опубликованным ранее данным о поверхностном натяжении монослоя лецитина, измеренного общепринятыми методами [8]. В то же время, формирование монослоя с помощью нанесения на поверхность воды раствора липида является нестандартным методом. Обычно поверхностную концентрацию липида меняют уменьшая общую площадь поверхности, перемещая специальную перегородку. В нашем случае

неочевидно, что весь липид, нанесенный на поверхность воды, встраивается в монослой, формируя максимально плотную упаковку. Хотя такой метод ранее уже применялся [9], вероятно, этот вопрос требует дополнительного изучения. Декремент затухания поверхностных волн при малой концентрации лецитина ($9.6 \cdot 10^{-3}$) соответствует затуханию на чистой поверхности и определяется объемной вязкостью воды. При увеличении концентрации лецитина наблюдается резкий рост декремента до значения примерно $34 \cdot 10^{-3}$ в области перегиба кривой поверхностного натяжения. Затем декремент уменьшается и стабилизируется на уровне $20 \cdot 10^{-3}$ при формировании плотного монослоя, что соответствует затуханию вблизи несжимаемой пленки. Интересно отметить, что максимум затухания поверхностных волн совпадает с максимумом производной функции поверхностного натяжения от концентрации липида. Этот факт подтверждает обоснованность введения в работе [7] параметра $\varepsilon = -\Gamma_0 d\sigma / d\Gamma$, определенного как упругая постоянная, характеризующая свойства липидной пленки на поверхности жидкости.

4. Изучение легочного сурфактанта

Легочный сурфактант (ЛС) представляет сложную смесь из фосфолипидов, липидов и белков, секретируемых в просвет альвеол специальными клетками [10]. Основной функцией ЛС является снижение поверхностного натяжения воды в альвеолах, чтобы предотвратить их схлопывание во время выдоха и снизить работу на их растяжение во время вдоха. Недостаточность функции сурфактантной системы может приводить к тяжелым патологиям, в частности, так называемому "респираторному дистресс синдрому" с высокой вероятностью летального исхода. Поэтому изучение механизмов функционирования сурфактантной системы человека и разработка искусственных сурфактантов для терапии недостаточности ЛС является весьма актуальной задачей.

В качестве образца мы использовали конденсат выдыхаемого воздуха человека. Такой способ выделения является простым, неинвазивным и позволяет получить основные фракции фосфолипидов, составляющих ЛС

человека. Компоненты сурфактанта в конденсате, вероятно, ассоциируются в виде везикул, образуя суспензию. 1 мл такой суспензии добавляли в объем раствора (100 мл) в измерительный сосуд. Затем измеряли кинетику изменения поверхностных свойств при формировании монослоя сурфактантных фосфолипидов. Везикулы, контактируя с поверхностью, могут обмениваться липидным материалом, формируя плотный монослой.

При добавлении конденсата выдыхаемого воздуха в измерительную ячейку первоначально устанавливается уровень поверхностного натяжения около 65 мН/м связанный, вероятно, с мгновенным распределением части липидного материала сурфактанта на поверхности. Затем следует кратковременный небольшой рост и резкое снижение поверхностного натяжения на 3 минуте до 55 мН/м, которое затем продолжается с меньшей скоростью вплоть до 50 мН/м. В то же время декремент затухания, составляющий вначале 0.01, характерный для чистой поверхности, резко вырастает до почти 0.06 и затем плавно уменьшается до 0.03 единиц. Наибольшее затухание, в соответствии с теорией, наблюдается в точке, близкой к области максимальной скорости изменения поверхностного натяжения.

Можно отметить относительно слабое уменьшение поверхностного натяжения при формировании монослоя липидов конденсата выдыхаемого воздуха (всего до 50 мН/м). Естественный сурфактант легкого человека снижает натяжение до 20 мН/м и ниже [11-12]. Очевидно, это обусловлено тем, что фосфолипидный состав конденсата значительно отличается от состава ЛС. В частности, в конденсате, вероятно, снижено содержание насыщенных фосфолипидов, а также отсутствуют специфические белки сурфактанта.

5. Заключение

В результате выполненной работы, создан лабораторный макет установки для реализации модернизированного нами метода генерации капиллярных волн в водной среде. Проведены измерения поверхностного натяжения и декремента затухания монослоев L- α -лецитина в зависимости от поверхностной концентрации, а также кинетики формирования монослоя компонент

легочного сурфактанта человека из конденсата выдыхаемого воздуха. Представленные результаты показали, что метод может быть использован как эффективный биофизический инструмент изучения поверхностных свойств липидных монослоев, в том числе, и при исследованиях чувствительности к микроволновому излучению в липидомике. Само по себе, всестороннее изучение липидного компонента биологических мембран несет ценную информацию. Этот подход позволяет определить особенности строения и функционирования биомембран при различных патологических состояниях, идентифицировать многие заболевания на ранних стадиях развития, своевременно предоставляя диагностические данные [13]. Наши предварительные результаты по микроволновому облучению липидных монослоев в экспериментах с регистрацией капиллярных волн по предложенной методике показали снижение поверхностного натяжения образца в среднем на 5 % во всем диапазоне изменений концентрации липидов.

Литература

1. Т.А. Ордынская, П.В. Поручиков, В.Ф. Ордынский. Волновая терапия. М.: Эксмо. 2008. 496 с.
2. Н.А. Мырзабаева. Применение лазеро- и КВЧ-пунктуры в эрадикационной терапии больных с функциональной диспепсией, ассоциированной с *Helicobacter pylori*. // Терапевтический вестник. 2009. № 4(24). С. 48-49.
3. М. Terpone, R. Avakyan. Extremely high-frequency therapy in oncology. // J. Alternative and Complementary Medicine. 2010. Vol. 16(11). P. 1211-1216.
4. I. Szabo, J. Kappelmayer, S.I. Alekseev, M.C. Ziskin. Millimeter wave induced reversible externalization of phosphatidylserine molecules in cells exposed in vitro. // Bioelectromagnetics. 2006. Vol. 27. P. 233-244.
5. К.Д. Казаринов. Исследование мембранотропной активности ЭМИ в широком диапазоне длин волн. // Электронная техника. Сер. 1. СВЧ - техника. 2018. Вып. 2 (537). С. 62-75.

6. С.В. Титов, В.С. Малинин, А.С. Титов, К.Д. Казаринов. Расчет параметров генерации капиллярных волн в водной среде. // Журнал радиоэлектроники [электронный журнал]. 2019. №1. Режим доступа <http://jre.cplire.ru/jre/jan19/6/text.pdf>
7. С.В. Титов, В.С. Малинин, А.С. Титов, К.Д. Казаринов. Исследования поверхностных свойств липидных монослоев – моделей биологических мембран. // Журнал радиоэлектроники [электронный журнал]. 2018, №10. Режим доступа <http://jre.cplire.ru/jre/oct18/13/text.pdf>
8. G.L. Gains, Jr. Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces. N.Y.: Interscience Publ. 1966. 386 p.
9. R.C. MacDonald, S.A. Simon. Lipid monolayer states and their relationship to bilayers. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. Vol. 84. P. 4089-4093.
10. В.А. Березовский, В.Ю. Горчаков. Поверхностно-активные вещества легкого. Киев: Наукова Думка. 1982. 168 с.
11. L.M.G. van Golde, J.J. Batenburg, B. Robertson. The Pulmonary Surfactant System. // News Physiol. Sci. 1994. Vol. 9. P. 13-20.
12. S.H. Yu, F. Possmayer, Adsorption, Compression and Stability of Surface Films from Natural, Lipid Extract and Reconstituted Pulmonary Surfactants. // Biochim. Biophys. Acta. 1993. Vol. 1167. P. 264-271.
13. Т.П. Новгородцева. Липидомика в медико-биологических исследованиях НИИ медицинской климатологии и восстановительного лечения. // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2009. № 4-5 (39-40). С. 133-137.

Для цитирования:

К. Д. Казаринов А. С. Титов, В. С. Малинин, С. В. Титов. Результаты экспериментального изучения поверхностных свойств липидных монослоев – моделей биологических мембран. Журнал радиоэлектроники [электронный журнал]. 2019. № 2. Режим доступа: <http://jre.cplire.ru/jre/feb19/10/text.pdf>
DOI 10.30898/1684-1719.2019.2.10