



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΟΛΥΤΕΧΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗΣ ΤΑΣΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ

υπό
ΣΤΑΥΡΟΥ ΣΤΑΜΑΤΗ

Διπλωματική Εργασία

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των απαιτήσεων για
την απόκτηση του Διπλώματος Μηχανολόγου Μηχανικού

Βόλος, 2024

© 2024 Σταύρος Σταμάτης

Η έγκριση της διπλωματικής εργασίας από το Τμήμα Μηχανολόγων Μηχανικών της Πολυτεχνικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

Πρώτος Εξεταστής (Επιβλέπων)	Δρ. Βασίλης Μποντόζογλου Καθηγητής, Τμήμα Μηχανολόγων Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Δεύτερος Εξεταστής	Δρ. Νικόλαος Ανδρίτσος Ομότιμος Καθηγητής, Τμήμα Μηχανολόγων Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τρίτος Εξεταστής	Δρ. Γεώργιος Χαραλάμπους Καθηγητής, Τμήμα Μηχανολόγων Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η εργασία αυτή αφιερώνεται στην οικογένεια μου, που με υποστήριξαν καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησής της με υπομονή, αγάπη και φροντίδα.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗΣ ΤΑΣΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΟΥ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ

ΣΤΑΥΡΟΣ ΣΤΑΜΑΤΗΣ

Τμήμα Μηχανολόγων Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2024

Επιβλέπων Καθηγητής: Δρ.Βασίλης Μποντόζογλου,

Περίληψη

Η κατανόηση των ιδιοτήτων του πνευμονικού επιφανειοδραστικού και της επίδρασής του στη δυναμική των κυψελίδων κατά τη διάρκεια του αναπνευστικού κύκλου είναι υψίστης σημασίας για τη φυσιολογία και την παθοφυσιολογία των πνευμόνων, καθώς και την ανάπτυξη θεραπευτικών μεθόδων βασιζόμενοι σε αυτό. Η πειραματική μέτρηση της επιφανειακής τάσης του πνευμονικού επιφανειοδραστικού χρησιμοποιείται τόσο για την κατανόηση της λειτουργίας, όσο και την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς του στην αναπνοή. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για την αξιολόγηση της συμπεριφοράς του επιφανειοδραστικού, συμπεριλαμβανομένων τεχνικών *in vivo*, *in situ* προσεγγίσεων και *in vitro* με τις τελευταίες να χρησιμοποιούνται συχνότερα στη βιβλιογραφία. Όσον αφορά τις *in vitro* μεθόδους, εστιάζουμε στις εξής: Η ισορροπία Langmuir-Wilhelmy, η μέθοδος Pulsating Bubble Surfactometer, η μέθοδος Captive Bubble Surfactometer και κλείνουμε με τις τεχνικές Constrained Sessile Drop και Constrained Drop Surfactometry με την τελευταία να είναι η πιο πρόσφατα ανεπτυγμένη μέθοδος. Κάθε μία από τις παραπάνω μεθόδους αναλύεται ως προς τις αρχές λειτουργίας, και τέλος παρουσιάζεται μια σύγκριση όλων των μεθόδων ως προς τα πλεονεκτήματα που παρέχει η κάθε μία, αλλά και ως προς τους περιορισμούς που τις διέπουν.

Λέξεις-κλειδιά: πνευμονικό επιφανειοδραστικό, αναπνευστικό σύστημα, *in vivo*, *in situ*, *in vitro* τεχνικές

METHODS OF MEASURING THE SURFACE TENSION OF THE PULMONARY SURFACTANT

STAVROS STAMATIS

Department of Mechanical Engineering, University of Thessaly, 2024

Supervisor: Dr V. Bontozoglou

Abstract

Understanding the properties of lung surfactant and its effect on alveolar dynamics during the respiratory cycle is of paramount importance for lung physiology and pathophysiology, as well as the development of therapeutics based on it. Experimental measurement of the surface tension of pulmonary surfactant is used both to understand the function and to evaluate its effectiveness in breathing. Various methods have been developed to evaluate surfactant behavior, including in vivo techniques, in situ approaches, and in vitro with the latter being most frequently used in the literature. Regarding the in vitro methods, we focus on the following: The Langmuir-Wilhelmy balance, the Pulsating Bubble Surfactometer method, the Captive Bubble Surfactometer method and we close with the Constrained Sessile Drop and Constrained Drop Surfactometry techniques with the latter being the most recently developed method. Each of the above methods is analyzed in terms of operating principles, and finally a comparison of all methods is presented in terms of the advantages that each one provides, but also in terms of the limitations that govern them.

Key words: pulmonary surfactant, respiratory system, in vivo, in situ, in vitro techniques

Πίνακας Περιεχομένων

Κεφάλαιο 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Κίνητρο και Υπόβαθρο	1
1.2 Βιβλιογραφική Ανασκόπηση	4
1.3 Οργάνωση Διπλωματικής Εργασίας	5
Κεφάλαιο 2. ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	7
2.1 Δομικά στοιχεία αναπνευστικού συστήματος	7
2.2 Πνευμονικό Επιφανειοδραστικό	11
2.2.1 Σύσταση επιφανειοδραστικού	13
Κεφάλαιο 3. ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ MEMBRANΩΝ	15
Κεφάλαιο 4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	19
4.1 Μέθοδοι in vivo: δοκιμές, πειράματα και διαδικασίες σε ολόκληρο ζωντανό οργανισμό, όπως ένα άτομο, ένα ζώο εργαστηρίου ή ένα φυτό.	19
4.2 Μέθοδοι in situ.....	21
4.3 Μέθοδοι in vitro	22
4.3.1 Ισορροπία Langmuir-Wilhelmy.....	23
4.3.2 Pulsating Bubble Surfactometer	27
4.3.3 Captive Bubble Surfactometer.....	30
4.3.4 Constrained Sessile Drop	38
4.3.5 Constrained Drop Surfactometry.....	40
4.3.6 Άλλες μέθοδοι in vitro	43
4.4 Σύνοψη	45
Κεφάλαιο 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	47
Βιβλιογραφία.....	52

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Φυσιολογικές λειτουργίες του πνευμονικού επιφανειοδραστικού, [10].....12

Πίνακας 2: Σύγκριση in vitro μεθόδων, [10].....48

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 2-1: Απεικόνιση των κύριων ανατομικών περιοχών της ανθρώπινης αναπνευστικής οδού, [2].	8
Σχήμα 2-2: Το εσωτερικό του κυψελιδικού τμήματος, όπως προκύπτει από τη μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων, [38], [39].	9
Σχήμα 2-3: Αριστερά: Η διάταξη των γενεών του αναπνευστικού συστήματος. Δεξιά: Μια πιο λεπτομερής σχηματική εικόνα του Αναπνευστικού Συστήματος, [5].	10
Σχήμα 2-4: Τυπική σύνθεση λιπιδίων και πρωτεϊνών του πνευμονικού επιφανειοδραστικού, [3].	13
Σχήμα 3-1: Απλή σχηματική διάταξη του πνευμονικού υγρού μέσα σε μια κυψελίδα, [6].	15
Σχήμα 3-2: Ισοθερμική συστολή-διαστολή από διεσπαρμένες διεπιφανειακές μεμβράνες διαφορετικής σύνθεσης σε επιφανειακόμετρο δέσμησης φυσαλίδων στους 37°C: φυσικό επιφανειοδραστικό που λαμβάνεται από βρογχοκυψελιδικές πλύσεις πνευμόνων χοίρου, [3].	16
Σχήμα 3-3: Μοντέλο για τις δεξαμενές επιφανειοδραστικών που σχετίζονται με τη διεπιφανειακή μονοστιβάδα, που δείχνει τους πιθανούς ρόλους των πρωτεϊνών επιφανειοδραστικών που σχετίζονται με τη μεμβράνη SP-A (πράσινο), SP-B (κόκκινο) και SP-C (μπλε) στον σχηματισμό τους, [3].	18
Σχήμα 4-1: Σχηματική αναπαράσταση ισορροπίας Langmuir–Wilhelmy, [10],[88].	24
Σχήμα 4-2: Ισόθερμη επιφάνειας πίεσης-περιοχής για το DPPC που δείχνει τις δισδιάστατες φάσεις του και η οριζόντια-plateau που αντιπροσωπεύει τη συνύπαρξη των φάσεων LE–LC, [56].	25
Σχήμα 4-3: Επίδραση των SP-B, SP-C σε ισόθερμες DPPC [56].	25
Σχήμα 4-4: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου pulsating bubble surfactometer, [3], [10].	28
Σχήμα 4-5: Σχηματική αναπαράσταση της Captive Bubble Surfactometer, [10].	32
Σχήμα 4-6: Τυπικές εικόνες CB (a) στα 21 mN/m και (b) στα 1.3 mN/m, [10].	33
Σχήμα 4-7: Αρχή αξονικής ανάλυσης σχήματος σταγόνας (ADSA), [10].	35
Σχήμα 4-8: a) Ισόθερμες συμπίεσης του DPPC σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών. b) Ισόθερμες συμπίεσης του DPPC που δείχνουν την επίδραση της προσθήκης SP-B/SP-C, [10].	37
Σχήμα 4-9: Σχηματική αναπαράσταση του Constrained Sessile Drop, [10].	39
Σχήμα 4-10: Τυπικές εικόνες CSD (a) στα 47 mN/m και (b) στα 0.68 mN/m, [10].	40

Σχήμα 4-11: Σχηματική αναπαράσταση του Constrained Drop Surfactometry, CDS, [37].....	42
Σχήμα 4-12: Τυπικές εικόνες PD (a) στα 42 mN/m και (b) στα 16 mN/m, [10].	44

Κεφάλαιο 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παρούσα εργασία συνοψίζει τις τρέχουσες γνώσεις σχετικά με τη σύνθεση της πνευμονικής επιφανειοδραστικής ουσίας και τις αλληλεπιδράσεις και τη δομή λιπιδίου-πρωτεΐνης, δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή σε αυτό που καθορίζει τη μηχανική του επιφανειοδραστικού και τι έχει βελτιστοποιηθεί για την προστασία και τη σταθεροποίηση της αναπνευστικής επιφάνειας.

1.1 Κίνητρο και Υπόβαθρο

Το κίνητρο πίσω από τη μελέτη της πνευμονικής επιφανειοδραστικής ουσίας έγκειται στον κρίσιμο ρόλο της στη διατήρηση της σωστής λειτουργίας των πνευμόνων και στην πρόληψη της αναπνευστικής δυσχέρειας. Το πνευμονικό επιφανειοδραστικό είναι ένα σύνθετο μείγμα λιπιδίων και πρωτεϊνών που ενισχύει την εσωτερική επιφάνεια των πνευμόνων και βοηθά στη μείωση της επιφανειακής τάσης των κυψελίδων (μικροί σάκοι αέρα). Ορισμένα βασικά κίνητρα για τη μελέτη της πνευμονικής επιφανειοδραστικής ουσίας είναι τα ακόλουθα:

- 1) Αναπνευστική λειτουργία: Η πνευμονική επιφανειοδραστική ουσία παίζει κρίσιμο ρόλο στη διαδικασία της αναπνοής. Μειώνει την επιφανειακή τάση εντός των κυψελίδων, αποτρέποντας την κατάρρευσή τους κατά την εκπνοή και επιτρέποντας την αποτελεσματική ανταλλαγή αερίων. Η κατανόηση της σύνθεσης, της ρύθμισης και της λειτουργίας του επιφανειοδραστικού είναι απαραίτητη για την κατανόηση της φυσιολογικής φυσιολογίας των πνευμόνων.
- 2) Σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας (Respiratory Distress Syndrome – RDS): Τα πρόωρα βρέφη συχνά στερούνται επαρκούς παραγωγής επιφανειοδραστικών, καταλήγοντας στο να αποκτήσουν σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας. Το RDS μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές αναπνευστικές δυσκολίες και είναι η κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας σε πρόωρα μωρά. Η μελέτη της πνευμονικής

επιφανειοδραστικής ουσίας βοηθά τους ερευνητές να αναπτύξουν στρατηγικές για τη διάγνωση, την πρόληψη και τη θεραπεία του RDS αποτελεσματικά.

- 3) Σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας ενηλίκων (Adults Respiratory Distress Syndrome – ARDS): Το ARDS είναι μια απειλητική κατάσταση για τη ζωή που χαρακτηρίζεται από οξεία πνευμονική βλάβη και σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια. Η δυσλειτουργική επιφανειοδραστική ουσία αλλά και αλλοιώσεις αυτής μπορούν να συμβάλουν στην ανάπτυξη του ARDS. Η έρευνα για την πνευμονική επιφανειοδραστική ουσία βοηθά στην κατανόηση των υποκείμενων μηχανισμών του ARDS και στη διερεύνηση πιθανών θεραπευτικών παρεμβάσεων.
- 4) Πνευμονοπάθειες: Διάφορες πνευμονικές παθήσεις, όπως η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (Chronic Obstructive Pulmonary Disease - COPD), το άσθμα και η κυστική ίνωση, εμπεριέχουν ανωμαλίες επιφανειοδραστικών. Η διερεύνηση της σύνθεσης και της λειτουργίας της πνευμονικής επιφανειοδραστικής ουσίας μπορεί να προσφέρει πληροφορίες για την παθογένεση και την εξέλιξη αυτών των ασθενειών, οδηγώντας ενδεχομένως σε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις.
- 5) Θεραπεία υποκατάστασης επιφανειοδραστικών: Η θεραπεία υποκατάστατου επιφανειοδραστικών είναι μια ιατρική παρέμβαση που περιλαμβάνει τη χορήγηση εξωγενούς επιφανειοδραστικής ουσίας σε άτομα με ανεπάρκεια ή δυσλειτουργία επιφανειοδραστικών. Η μελέτη της επιφανειοδραστικής ουσίας επιτρέπει τη βελτίωση των σκευασμάτων επιφανειοδραστικών και των μεθόδων χορήγησης, οδηγώντας σε καλύτερα αποτελέσματα θεραπείας για τους ασθενείς.

Συνολικά, η κατανόηση των περιπλοκών του πνευμονικού επιφανειοδραστικού και του ρόλου του στη φυσιολογία και τις ασθένειες των πνευμόνων είναι ζωτικής σημασίας για την προώθηση των γνώσεών μας σχετικά με την αναπνευστική υγεία και τη βελτίωση των στρατηγικών κλινικής διαχείρισης. Για αυτό το λόγο είναι σημαντική η μελέτη των πειραμάτων και των μεθόδων *in vivo*, *in situ* και (των πιο τελευταίων) *in vitro* μεθόδων πνευμονικού επιφανειοδραστικού.

Οι *in vivo* μελέτες περιλαμβάνουν πειράματα που διεξάγονται σε έναν ζωντανό οργανισμό, συνήθως ένα ζωικό μοντέλο ή ανθρώπινα υποκείμενα. Οι ερευνητές μπορούν να χειριστούν και να αναλύσουν την πνευμονική επιφανειοδραστική ουσία μέσα στο φυσικό της φυσιολογικό πλαίσιο. Οι *in vivo* μελέτες παρέχουν πολύτιμες γνώσεις σχετικά με τη δυναμική των επιφανειοδραστικών, τον ρόλο του στην πνευμονική λειτουργία και τις

αλληλεπιδράσεις του με άλλες φυσιολογικές διεργασίες. Για παράδειγμα, οι ερευνητές μπορούν να μετρήσουν τα επίπεδα επιφανειοδραστικής ουσίας, να αξιολογήσουν τη λειτουργία της επιφανειοδραστικής ουσίας κατά τη διάρκεια των κύκλων αναπνοής ή να διερευνήσουν την επίδραση διαφόρων παραγόντων στην παραγωγή και έκκριση επιφανειοδραστικών. Οι *in vivo* μελέτες επιτρέπουν μια ολοκληρωμένη κατανόηση της συμπεριφοράς του επιφανειοδραστικού και της σημασίας του για τη διατήρηση της αναπνευστικής υγείας. Ωστόσο, η διεξαγωγή πειραμάτων *in vivo* μπορεί να είναι περίπλοκη, χρονοβόρα και ηθικά αμφιλεγόμενη όταν εμπλέκονται ανθρώπινα υποκείμενα.

Οι *in situ* μελέτες περιλαμβάνουν την εξέταση του πνευμονικού επιφανειοδραστικού στο φυσικό του περιβάλλον, συνήθως μέσα σε αποκομμένο πνευμονικό ιστό ή σε κομμάτια πνεύμονα. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει τη διερεύνηση των ιδιοτήτων και των συμπεριφορών των επιφανειοδραστικών ουσιών σε ένα ελεγχόμενο αλλά εξειδικευμένο για το όργανο περιβάλλον. Οι ερευνητές μπορούν να αναλύσουν τη σύνθεση της επιφανειοδραστικής ουσίας, να μελετήσουν την κατανομή της στον πνεύμονα και να αξιολογήσουν τη λειτουργικότητά της υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Οι επιτόπιες μελέτες επιτρέπουν μια πιο λεπτομερή εξέταση των σχέσεων δομής-λειτουργίας επιφανειοδραστικών και της επίδρασης εξωτερικών παραγόντων στη συμπεριφορά των επιφανειοδραστικών. Ωστόσο, οι *in situ* μελέτες μπορεί να μην αναπαράγουν πλήρως τις πολύπλοκες φυσιολογικές αλληλεπιδράσεις που παράγουν οι *in vivo* και τα μεγέθη του δείγματος συχνά περιορίζονται στα διαθέσιμα δείγματα ιστών.

Αντίθετα, οι *in vitro* μελέτες περιλαμβάνουν τη διεξαγωγή πειραμάτων σε εργαστηριακό περιβάλλον χρησιμοποιώντας μεμονωμένα συστατικά του πνευμονικού επιφανειοδραστικού, όπως λιπίδια ή συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Οι ερευνητές μπορούν να διερευνήσουν τις ιδιότητες και τις συμπεριφορές των επιφανειοδραστικών υπό ελεγχόμενες συνθήκες, επιτρέποντας τον ακριβή χειρισμό και τη μέτρηση συγκεκριμένων μεταβλητών. Οι *in vitro* μελέτες επιτρέπουν στους ερευνητές να αποσαφηνίσουν τους μηχανισμούς επιφανειοδραστικών ουσιών, να εξετάσουν τις αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια και να διερευνήσουν τα αποτελέσματα των πειραματικών παρεμβάσεων. Αυτή η προσέγγιση παρέχει πολύτιμες μηχανικές γνώσεις σχετικά με τη συμπεριφορά των επιφανειοδραστικών και μπορεί να βοηθήσει στην απομόνωση συγκεκριμένων συστατικών ή παραγόντων που συμβάλλουν στη λειτουργία του επιφανειοδραστικού. Ωστόσο, οι *in vitro* μελέτες μπορεί να μην έχουν την πολυπλοκότητα και τις αλληλεπιδράσεις που

παρουσιάζονται στον πνεύμονα και η προέκταση των ευρημάτων στο *in vivo* πλαίσιο θα πρέπει να γίνεται με προσοχή.

Η συνεισφορά αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι στο συνδυασμό πληροφοριών από τις μελέτες *in vivo*, *in situ* και *in vitro*, που είναι ζωτικής σημασίας για μια ολοκληρωμένη κατανόηση της πνευμονικής επιφανειοδραστικής ουσίας. Κάθε μέθοδος έχει τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς της και η κατάλληλη χρήση τους εξαρτάται από τα συγκεκριμένα ερευνητικά ερωτήματα, τους διαθέσιμους πόρους και τα ηθικά ζητήματα. Συλλογικά, αυτές οι προσεγγίσεις συμβάλλουν στην προώθηση των γνώσεών μας για την πνευμονική επιφανειοδραστική ουσία και τη σημασία της στην υγεία και τις ασθένειες των πνευμόνων.

1.2 Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

Η έρευνα για την πνευμονική επιφανειοδραστική ουσία έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας όλα αυτά τα χρόνια. Πολυάριθμες μελέτες και επιστημονικές δημοσιεύσεις έχουν συμβάλει στην κατανόηση της σύνθεσης, της λειτουργίας, της ρύθμισης και της κλινικής σημασίας του. Στην παρούσα εργασία ακολουθήθηκε μια εκτενής επισκόπηση του βιβλιογραφικού τοπίου που σχετίζεται με την πνευμονική επιφανειοδραστική ουσία:

- Σύνθεση και δομή: Ερευνήθηκαν μελέτες για τον χαρακτηρισμό της σύνθεσης του πνευμονικού επιφανειοδραστικού, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδικών συστατικών του (φωσφολιπίδια, χοληστερόλη, κ.λπ.) και των σχετικών πρωτεϊνών (πρωτεΐνες επιφανειοδραστικών A, B, C και D). Άλλες μελέτες έχουν διερευνήσει τη μοριακή δομή των μορίων επιφανειοδραστικών και τη διάταξή τους στη διεπιφάνεια αέρα-υγρού εντός των πνευμόνων (π.χ. [1], [2], [3], κλπ.).
- Βιοσύνθεση και αρχές: Η κατανόηση της βιοσύνθεσης, της έκκρισης και της ρύθμισης της πνευμονικής επιφανειοδραστικής ουσίας ήταν ένας σημαντικός ερευνητικός τομέας. Οι έρευνες έχουν αποσαφηνίσει τους ρόλους συγκεκριμένων ενζύμων και κυτταρικών οδών που εμπλέκονται στην παραγωγή, επεξεργασία και διακίνηση επιφανειοδραστικών ουσιών. Οι ερευνητές έχουν εξερευνήσει τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς και τους παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση και την έκκριση επιφανειοδραστικών (π.χ. [7], [8], [9], κλπ.).

- Λειτουργία επιφανειοδραστικών και βιοφυσικές ιδιότητες: Αυτές οι μελέτες έχουν επικεντρωθεί στις βιοφυσικές ιδιότητες του πνευμονικού επιφανειοδραστικού και στο ρόλο του στη μείωση της επιφανειακής τάσης στη διεπιφάνεια αέρα-υγρού εντός των κυψελίδων. Τα συγκεκριμένα paper έχουν διερευνήσει τις μηχανικές ιδιότητες των επιφανειοδραστικών μεμβρανών, την ικανότητά τους να διατηρούν την κυψελιδική σταθερότητα και τον αντίκτυπό του στη συμμόρφωση των πνευμόνων και την ανταλλαγή αερίων (π.χ. [10], [16], κλπ.).
- Θεραπεία αντικατάστασης επιφανειοδραστικών ουσιών (Surfactant Replacement Therapy): Οι συγκεκριμένες μελέτες έχουν στόχο να αναπτύξουν και να βελτιώσουν θεραπείες αντικατάστασης επιφανειοδραστικών για τη θεραπεία ελλείψεων επιφανειοδραστικών και σχετικών διαταραχών. Οι μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε πειράματα, στη βελτιστοποίηση των σκευασμάτων επιφανειοδραστικών, των μεθόδων χορήγησης, των στρατηγικών δοσολογίας και στην αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειάς τους, (π.χ. [44] - [86]).

1.3 Οργάνωση Διπλωματικής Εργασίας

Το υπόλοιπο αυτής της διπλωματικής εργασίας χωρίζεται σε τέσσερις ενότητες που καταλαμβάνουν τα Κεφάλαιο 2 - 5, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα:

Πρώτα, το Κεφάλαιο 2 είναι μια επισκόπηση του αναπνευστικού συστήματος. Έμφαση δίνεται στα χαρακτηριστικά του πνευμονικού επιφανειοδραστικού όσον αφορά τη σύνθεση, τη λειτουργία και τη μηχανική του συμπεριφορά.

Το Κεφάλαιο 3 υπογραμμίζει τα κύρια χαρακτηριστικά μιας επιφανειοδραστικής ουσίας από τις βασικές Θερμοδυναμικές αρχές. Η συμπεριφορά ισορροπίας αναλύεται πρώτα και ακολουθεί η δυναμική συμπεριφορά της επιφανειακής τάσης και η ισορροπία μάζας επιφανειοδραστικών όταν τα επιφανειοδραστικά προσροφούνται σε μη σταθερές επιφάνειες. Επίσης, στο κεφάλαιο αυτό αναλύονται και οι βιοφυσικές ιδιότητες του λειτουργικού πνευμονικού επιφανειοδραστικού.

Το Κεφάλαιο 4 είναι μια βιβλιογραφική ανασκόπηση προηγούμενων μελετών που αφορούσαν τις προηγούμενες ερευνητικές προσπάθειες για τη μαθηματική μοντελοποίηση και αξιολόγηση της αλλαγής της επιφανειακής τάσης στις κυψελίδες και τη διερεύνηση της μηχανικής του υγρού του στρώματος επικαλυμμένου με πνευμονικού επιφανειοδραστικού

στις κυψελίδες. Πιο συγκεκριμένα μελετώνται οι *in vivo*, *in situ* και *in vitro* μέθοδοι, εστιάζοντας στις *in vitro* μεθόδους.

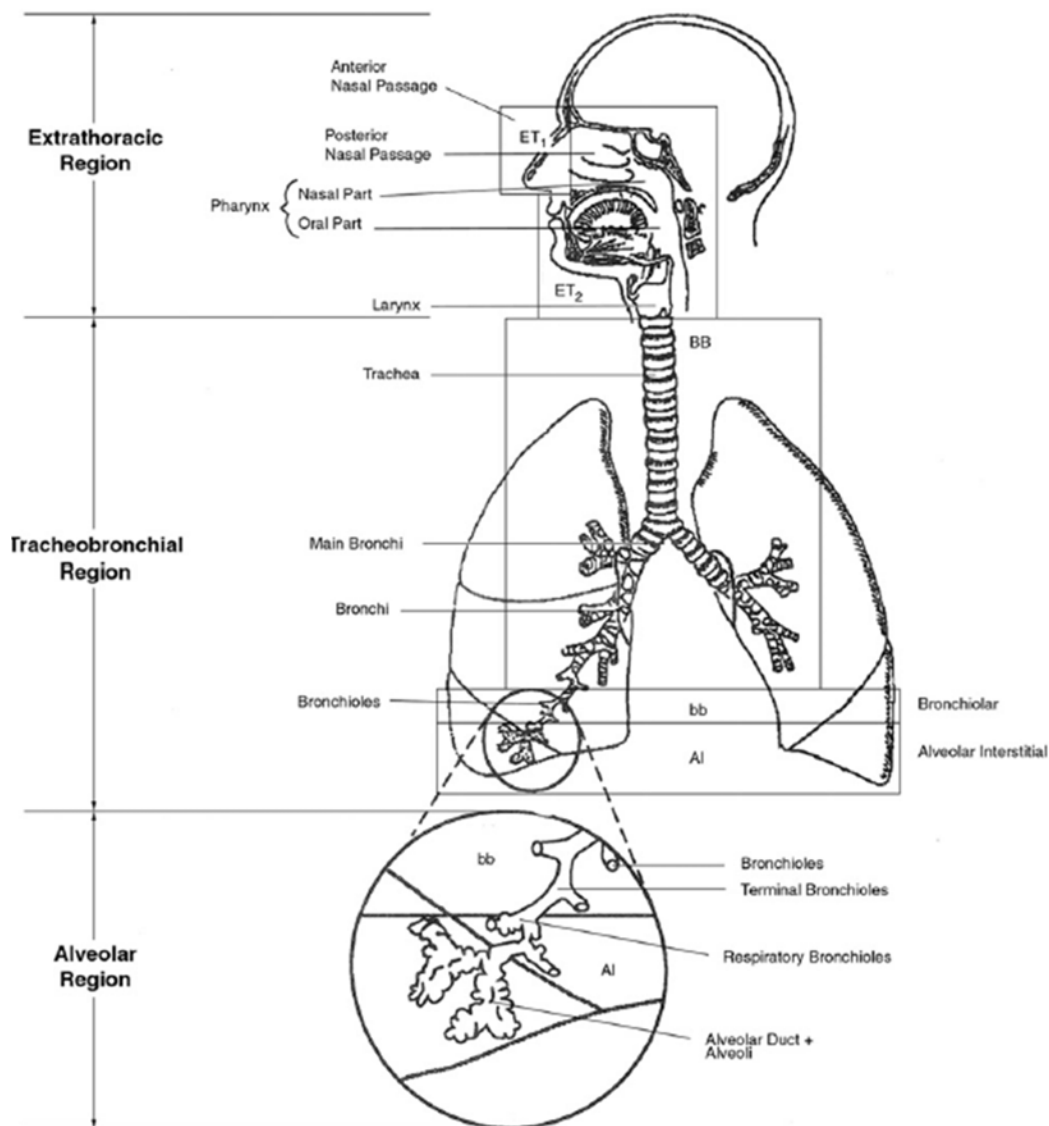
Τα τελικά συμπεράσματα της διπλωματικής εργασίας, όπως η συνολική σύγκριση των μεθόδων, κατευθύνσεις για περαιτέρω έρευνα και σκέψεις για το μέλλον, παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο 5.

Κεφάλαιο 2. ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφουμε συνοπτικά τα βασικά δομικά στοιχεία του αναπνευστικού συστήματος καθώς και βασικές έννοιες του πνευμονικού επιφανειοδραστικού όπως σύσταση, λειτουργίες.

2.1 Δομικά στοιχεία αναπνευστικού συστήματος

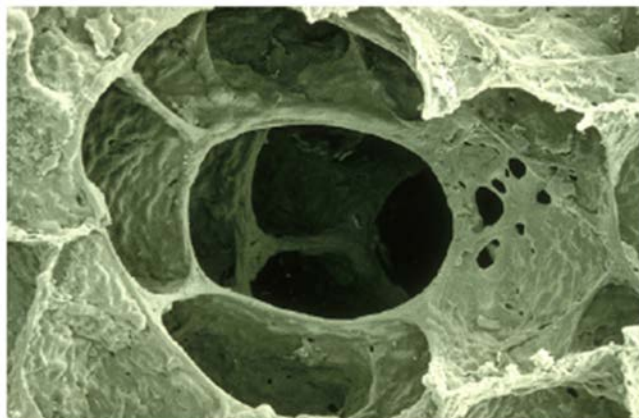
Το αναπνευστικό σύστημα αποτελείται από δύο πνεύμονες, δεξιό και αριστερό, που βρίσκονται στον θώρακα και συνδέονται μέσω των πρωταρχικών τους βρόγχων με την τραχεία και τον ανώτερο αεραγωγό της μύτης και του στόματος. Στη συνέχεια σχηματίζονται οι βρόγχοι, ή γενικότερα οι αεραγωγοί, οι οποίοι σχηματίζουν ένα δίκτυο διακλαδώσεων, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2-1.



Σχήμα 2-1: Απεικόνιση των κύριων ανατομικών περιοχών της ανθρώπινης αναπνευστικής οδού, [2].

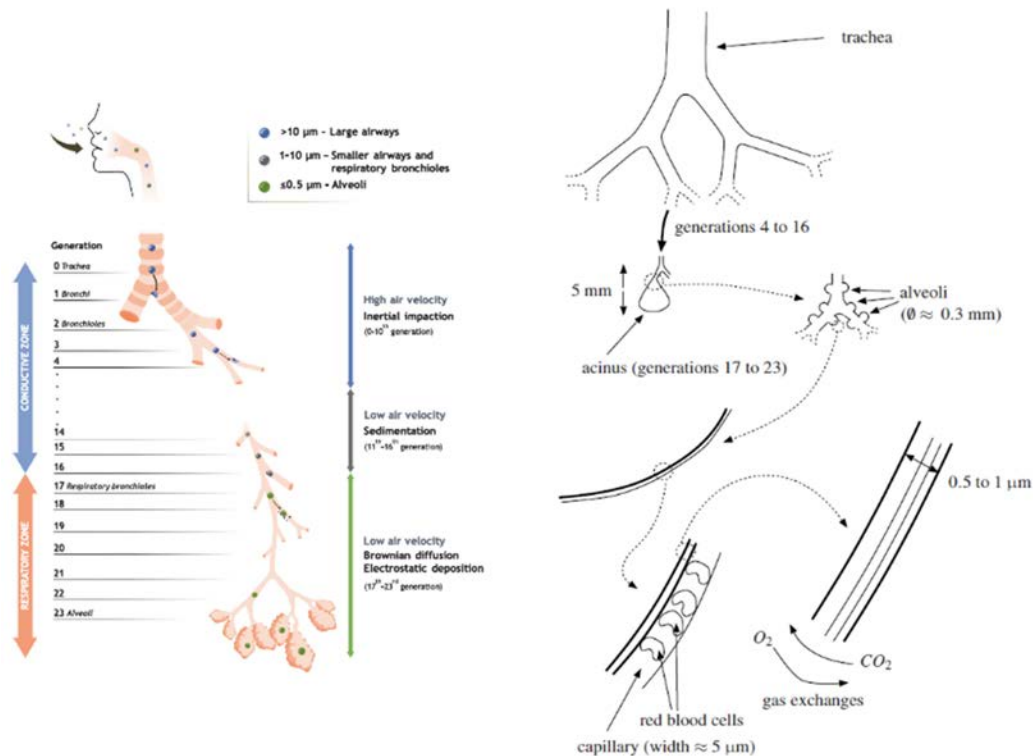
Κάθε επίπεδο διακλάδωσης ονομάζεται γενιά (generation), ξεκινώντας από την τραχεία ως γενιά $n=0$, τους πρωτογενείς βρόγχους, τη γενιά $n=1$ και ούτω καθεξής. Για ένα τέλεια διχαλωτό σύστημα, θα υπάρχουν 2^n σωλήνες αεραγωγών στη n -οστή γενιά. Για τους αεραγωγούς από την τραχεία μέχρι και περίπου την $16^{\text{η}}$, κατά τη διάρκεια της αναπνοής (respiration) ο αέρας απλά εισέρχεται (εισπνοή) και εξέρχεται (εκπνοή) χωρίς να συντελείται ανταλλαγή αερίων οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα. Ωστόσο, για $17 \leq n \leq 19$ (πιο συγκεκριμένα για $n=16$ ή $n=17$), οι αεραγωγοί αρχίζουν να έχουν πάνω στα τοιχώματα μικρές κατασκευές το εσωτερικό των οποίων μοιάζει με σπηλιά και το

σχήμα τους σαν σταφίδα (grape - shaped) που ονομάζονται κυψελίδες (alveoli), όπως φαίνονται στο Σχήμα 2-2.



Σχήμα 2-2: Το εσωτερικό του κυψελιδικού τμήματος, όπως προκύπτει από τη μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων, [38], [39].

Οι κυψελίδες έχουν λεπτά τοιχώματα και είναι επικαλυμμένες εξωτερικά με ένα πλούσιο δίκτυο τριχοειδών αγγείων από όπου διέρχεται το αίμα. Στις κυψελίδες συντελείται η ανταλλαγή αερίων και συγκεκριμένα η εναλλαγή οξυγόνου με CO_2 . Αυτοί οι ειδικοί αεραγωγοί είναι τα αναπνευστικά βρογχιόλια (respiratory bronchioles). Για $20 \leq n \leq 22$, τα τοιχώματα των αεραγωγών είναι εξ' ολοκλήρου επικαλυμμένα από κυψελίδες, και στη συνέχεια για $n=23$, υπάρχουν οι τερματικοί κυψελιδικοί σάκοι (terminal alveoli) που είναι συστάδες κυψελίδων. Από τις γενιές $n=17$ μέχρι τους κυψελιδικούς σάκους, είναι η αναπνευστική ζώνη, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2-3. Στις κυψελίδες συντελείται η εναλλαγή του Οξυγόνου που περιέχει ο ατμοσφαιρικός αέρας με το CO_2 .



Σχήμα 2-3: Αριστερά: Η διάταξη των γενεών του αναπνευστικού συστήματος. Δεξιά: Μια πιο λεπτομερής σχηματική εικόνα του Αναπνευστικού Συστήματος, [5].

Απλώς για σύγκριση, η διάμετρος της τραχείας είναι $d_0=1,8\text{cm}$ σε έναν ενήλικα, ενώ η διάμετρος μιας τερματικής κυψελίδας είναι $\sim 200-300\ \mu\text{m}$, [1]. Γενικά η χρησιμότητα των κυψελίδων είναι να διαθέτουν όσο το δυνατόν μεγαλύτερη επιφάνεια για την ανταλλαγή των αερίων, πράγμα που φαίνεται από τον κατά μέσο όρο αριθμό τους στο αναπνευστικό σύστημα. Συγκεκριμένα, υπολογίζεται ότι οι πνεύμονες έχουν περίπου $3 \cdot 10^8$ κυψελίδες και ισοδυναμούν με συνολική επιφάνεια εναλλαγής αερίων $90\ \text{m}^2$ (σχεδόν ίση με ένα γήπεδο τένις), [1].

Το εσωτερικό του πνεύμονα είναι επικαλυμμένο με ένα λεπτό φιλμ υγρού, [1]. Η υγρή στιβάδα είναι απλώς η ορώδης στιβάδα πιο έξω στον πνεύμονα και τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II παράγουν επιφανειοδραστικά που προσανατολίζεται στη διεπιφάνεια αέρα-υγρού και μειώνουν σημαντικά την επιφανειακή τάση. Οι δυνάμεις επιφανειακής τάσης στη διεπιφάνεια αέρα-υγρού έχουν αντίθετη κατεύθυνση με της εισπνοής των πνευμόνων και η μείωση αυτών των δυνάμεων είναι κρίσιμη για τη φυσιολογική αναπνοή. Σε επόμενη υποενότητα αναφέρονται πιο αναλυτικά τα χαρακτηριστικά των επιφανειοδραστικών μορίων και οι θερμοδυναμικές αρχές που τα διέπουν, [1], [5].

2.2 Πνευμονικό Επιφανειοδραστικό

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το αναπνευστικό σύστημα είναι υπεύθυνο για την διέλευση αέρα, που εξασφαλίζεται από την κυκλική διαδικασία εισπνοής-εκπνοής, και είναι επίσης υπεύθυνο για την ανταλλαγή οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα ανάμεσα στην ατμόσφαιρα και στις κυψελίδες του κυκλοφοριακού συστήματος. Αυτή η αναπνευστική ανταλλαγή αερίων λαμβάνει χώρα μέσω ενός σχετικά πολύπλοκου φυσικού συνόρου, το οποίο αποτελείται από τη λεπτή υδάτινη μεμβράνη που καλύπτει το εσωτερικό μιας κυψελίδας, τα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα (epithelial cells), το ενδιάμεσο στρώμα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα που σχηματίζουν τα τριχοειδή αγγεία του αίματος, το πλάσμα του αίματος και, τέλος, τη μεμβράνη των ερυθρών κυττάρων. Λόγω της υγρής εσωτερικής επένδυσης μέσα στις κυψελίδες, η οποία είναι συνέπεια του κυτταρικού μεταβολισμού, οι πνεύμονες πρέπει να υπερνικήσουν τη δύναμη που αντιτίθεται στην αναπνοή. Για να υπερνικηθεί η δύναμη λόγω της επιφανειακής τάσης που αντιτίθεται στην διαστολή των κυψελίδων, τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II παράγουν και εκκρίνουν πνευμονικό επιφανειοδραστικό, ένα ειδικό υλικό που είναι υπεύθυνο για την ελαχιστοποίηση των μηχανικών δυνάμεων που τείνουν να κάνουν τους πνεύμονες να καταρρεύσουν, ειδικά στο τέλος της εκπνοής. Το επιφανειο δραστικό, το οποίο αποτελείται κυρίως από αμφιπαθή μόρια, σχηματίζει αυθόρμητα σταθερές μεμβράνες στη διεπιφάνεια αέρα-νερού, ικανές να μειώσουν δραματικά την επιφανειακή τάση του νερού. Ο λόγος για αυτό είναι ότι οι πολικές ομάδες σε μόρια επιφανειοδραστικών ουσιών δημιουργούν πολικές αλληλεπιδράσεις με μόρια νερού της επιφάνειας και, έτσι, μειώνουν τις καθαρές διαμοριακές συνεκτικές δυνάμεις. Επομένως, μαζί με τους αναπνευστικούς κύκλους, ελαχιστοποιείται το έργο της αναπνοής κατά την εισπνοή, γεγονός που παρέχει μια μεγάλη περιοχή έκθεσης για ανταλλαγή αερίων, ενώ η επιφάνεια των κυψελίδων προστατεύεται από την κατάρρευση κατά την εκπνοή. Τόσο οι παθητικές ελαστικές ιδιότητες του πνευμονικού ιστού όσο και οι μηχανικές ιδιότητες των μεμβρανών του επιφανειοδραστικού φαίνεται να συμβάλλουν εξίσου στην κυψελική σταθερότητα, η οποία μπορεί να σχετίζεται άμεσα με την πρόληψη απέναντι σε διαφορετικές αναπνευστικές δυσλειτουργίες και παθολογίες. Επιπλέον, η ύπαρξη και σωστή λειτουργία του πνευμονικού επιφανειοδραστικού είναι συνδεδεμένη με αμυντικές λειτουργίες έναντι παθογόνων μικροοργανισμών, σωματιδίων (micro-nanoparticles) που εισέρχονται στο αναπνευστικό σύστημα κατά την αναπνοή. Μια σύνοψη των εν λόγω λειτουργιών περιγράφει ο Πίνακας 1.

Πίνακας 1: Φυσιολογικές λειτουργίες του πνευμονικού επιφανειοδραστικού, [10].

Surface tension related	Non-surface tension related
Maintaining a large gas transfer area	Specific and non-specific host defense
Increasing lung compliance on inspiration	Pathogen barrier
Stabilizing alveoli on expiration	Antibacterial/antiviral activity
Airway stabilization	Smooth muscle relaxation
Anti-edema effects	
Anti-adhesion agent	
Protecting epithelial cells in airway reopening	
Facilitating mucociliary transport	
Fluid dispersal	
Particle removal	

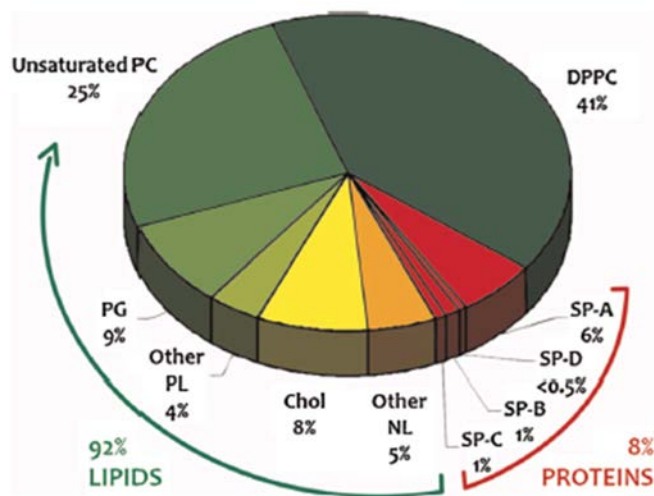
Η ανεπάρκεια επιφανειοδραστικού που προκύπτει από τη μη καθολική ανάπτυξη των πνευμόνων σε πρόωρα μωρά οδηγεί στο σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας νεογνών (Neonatal Respiratory Distress Syndrome – NRDS) και η αδρανοποίηση των επιφανειοδραστικών συστατικών ως συνέπεια οξείας πνευμονικής βλάβης μπορούν να συμβάλει στο οξύ αναπνευστικό σύνδρομο δυσφορίας (Acute Respiratory Distress Syndrome – ARDS) τόσο σε παιδιά όσο και σε ενήλικες. Τα παραπάνω σύνδρομα και παθολογίες σχετίζονται επομένως με δυσλειτουργία, ανεπάρκεια ή αδρανοποίηση επιφανειοδραστικών και σχετίζονται με την αδυναμία διατήρησης των απαραίτητων συνθηκών για τη διέλευση του αέρα, [3].

Η βιοφυσική λειτουργία του επιφανειοδραστικού για τη μηχανική σταθεροποίηση της κυψελιδικής επιφάνειας επιτυγχάνεται όχι μόνο με τη δημιουργία μιας ενιαίας διεπιφανειακής μονοστιβάδας αμφιπαθών μορίων στη διεπιφάνεια αέρα-υγρού, αλλά και με τη δημιουργία ενός ολόκληρου δικτύου διασυνδεδεμένων μεμβρανών μεταξύ της διεπιφανειακής μεμβράνης και των δομών που σχετίζονται με την επιφάνεια. Αυτές οι μεμβράνες λειτουργούν ως δεξαμενές επιφανειοδραστικών μορίων. Έτσι, οι μηχανικές ιδιότητες των επιφανειακών στρωμάτων του επιφανειοδραστικού καθορίζονται από τη μηχανική τόσο των μονοστιβάδων όσο και των διπλών στοιβάδων και από την ισχυρή σύνδεση μεταξύ τους· που όλα είναι συνέπεια της μοναδικής σύνθεσης λιπιδίων-πρωτεϊνών, [3].

Απαραίτητα κριτήρια για να είναι αποτελεσματικό ένα διάλυμα πνευμονικού επιφανειοδραστικού, είτε τεχνητό είτε φυσικό, θα πρέπει να ικανοποιεί ορισμένα κριτήρια σε φυσιολογικές συνθήκες α) να προσροφάται γρήγορα στη διεπιφάνεια αέρα/νερού με τον αντίστοιχο απαιτούμενο χρόνο να είναι μερικά δευτερόλεπτα, β) να μειώνει την επιφανειακή τάση σε πολύ χαμηλή τιμή, η οποία είναι γενικά αποδεκτή για τιμές μικρότερες από 10 mN m^{-1} , [4], και γ) να αποτρέπει την αύξηση της επιφανειακής τάσης κατά τη διαστολή στη φάση της εισπνοής. Με την τενσιομετρία (tensiometry) του πνευμονικού επιφανειοδραστικού η χρονική συμπεριφορά της επιφανειακής τάσης θα πρέπει να ανταποκρίνεται στα προαναφερθέντα τρία κριτήρια.

2.2.1 Σύσταση επιφανειοδραστικού

Το πνευμονικό επιφανειοδραστικό(pulmonary/lung surfactant) είναι ένα μείγμα λιπιδίων και ορισμένων ειδικών πρωτεϊνών. Μια τυπική σύνθεση του συγκεκριμένου επιφανειοδραστικού σε θηλαστικά παρουσιάζεται στο Σχήμα 2-4. Τα λιπίδια καταλαμβάνουν την πλειοψηφία της σύστασης του εν λόγω επιφανειοδραστικού, συγκεκριμένα περίπου το 90%-92% κατά βάρος. Σε αυτό το ποσοστό κυριαρχούν τα φωσφολιπίδια, που αντιπροσωπεύουν το 8-15% της συνολικής μάζας επιφανειοδραστικής ουσίας σε πνεύμονες θηλαστικών.



Σχήμα 2-4: Τυπική σύνθεση λιπιδίων και πρωτεϊνών του πνευμονικού επιφανειοδραστικού, [3].

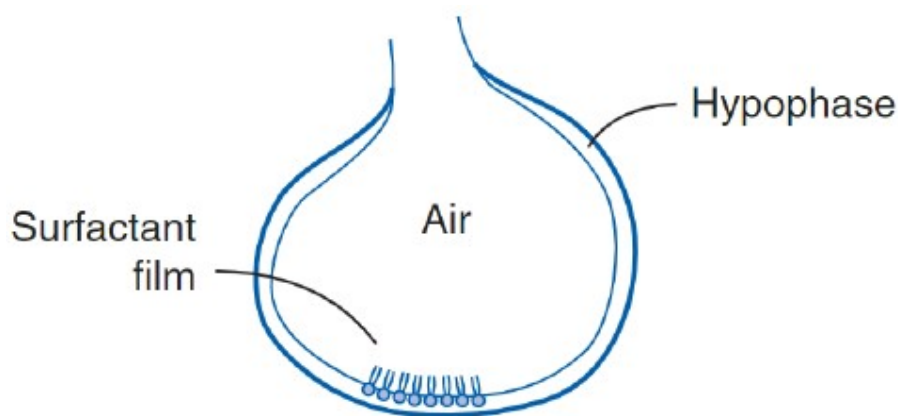
Από τα φωσφολιπίδια που συμμετέχουν στην σύσταση του επιφανειοδραστικού, το πιο άφθονο είναι η διπαλμιτοϋλφωσφατιδυλοχολίνη (DipalmitoylPhosPhatidylCholine – DPPC) και καταλαμβάνει το 40-80% κατά βάρος,[7]. Το DPPC είναι υπεύθυνο για την

σημαντικότερη ιδιότητα του επιφανειοδραστικού, η οποία είναι η μεγάλη μείωση της επιφανειακής τάσης του υγρού υμένα στο εσωτερικό κυψελιδών, από 70 mN/m, [40], δηλαδή την τιμή της σ του νερού χωρίς καθόλου επιφανειοδραστικό σε φυσιολογική θερμοκρασία, δηλαδή 37°C, μέχρι τιμές κοντά στο 0-5 mN/m, [3], [8], [9]. Ωστόσο, αν και το DPPC συντελεί την σημαντικότερη διεργασία από αυτές που πρέπει να διενεργεί το επιφανειοδραστικό από μόνο του έχει αποκλειστεί ως κατάλληλο υποψήφιο πνευμονικό επιφανειοδραστικό για κλινικούς σκοπούς όπως η SRT, καθώς προσρροφάται αργά σε επιφάνεια νερού-αέρα, ενώ απαιτείται από το επιφανειοδραστικό να προσρροφάται σε χρόνους αντίστοιχους με αυτούς της αναπνοής, δηλαδή για λίγα δευτερόλεπτα. Το χαρακτηριστικό αυτό έρχεται να συμπληρώσει ο ρόλος των πρωτεϊνών.

Από την πλευρά των πρωτεϊνών, το ποσοστό τους καταλαμβάνει περίπου το 10% κατά βάρος. Οι κύριες πρωτεΐνες του πνευμονικού επιφανειοδραστικού είναι σε αριθμό 4 και μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες: SP-A και SP-D (υδρόφιλες) και SP-B και SP-C (υδρόφοβες), [3], [10]. Κάθε μία από αυτές τις πρωτεΐνες συμβάλλει μοναδικά στη φυσιολογική λειτουργία του επιφανειοδραστικού συστήματος των πνευμόνων. Η SP-A βελτιώνει την επιφανειακή δραστηριότητα του επιφανειοδραστικού στη διεπιφάνεια της μεμβράνης και κατά μήκος του, η SP-D ενισχύει την άμυνα του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω της δέσμευσης εξωτερικών παθογόνων οργανισμών όπως βακτήρια, μύκητες και ιούς. Οι SP-B και SP-C συμβάλλουν στον σχηματισμό ευσταθών προσρροφηθέντων μονοστοιβάδων (film) επιφανειοδραστικού. Ωστόσο, η έλλειψη ή η ανεπάρκεια αυτών των πρωτεϊνών σχετίζεται με συγκεκριμένα προβλήματα, π.χ. η έλλειψη SP-B οδηγεί σε αναπνευστικές παθολογίες και η ανεπάρκεια σε SP-C είναι θανατηφόρα, [4], [5].

Κεφάλαιο 3. ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

Η επιφανειακή τάση προκύπτει σε μια διεπιφάνεια αέρα-νερού λόγω μιας ανισορροπίας των ελκτικών αλληλεπιδράσεων, κυρίως δεσμών υδρογόνου, μεταξύ των μορίων του νερού που έρχονται σε άμεση επαφή με την αέρια φάση, ενώ εξισορροπούνται πλήρως σε όλες τις κατευθύνσεις του χώρου στη φάση όγκου.

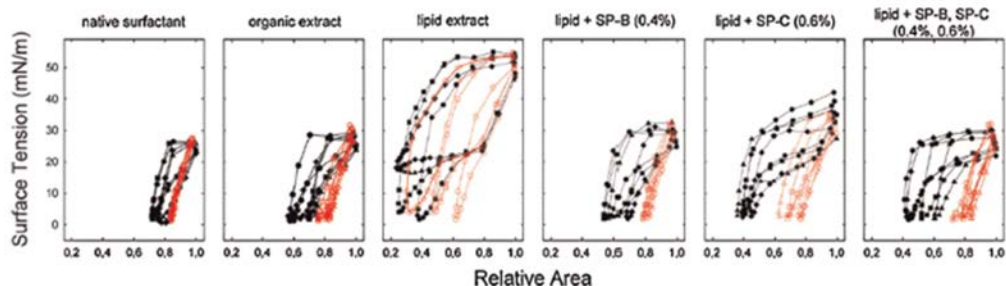


Σχήμα 3-1: Απλή σχηματική διάταξη του πνευμονικού υγρού μέσα σε μια κυψελίδα, [6].

Οι μεμβράνες επιφανειοδραστικών που παράγονται και εκκρίνονται από πνευμονοκύτταρα τύπου II πρέπει να απορροφώνται πολύ γρήγορα και, όπως έχει αποδειχθεί ευρέως, οι υδρόφοβες πρωτεΐνες SP-B και SP-C έχουν κύριο ρόλο σε αυτή τη διαδικασία. In vitro, τόσο το SP-B όσο και το SP-C, μαζί ή χωριστά, ενισχύουν σημαντικά τη διεπιφανειακή απορρόφηση των λιπιδικών κυστιδίων.

Είναι σημαντικό να γίνει διάκριση μεταξύ δύο διαφορετικών διεργασιών που συνήθως κατονομάζονται το ίδιο στο πλαίσιο της πνευμονικής επιφανειοδραστικής ουσίας, γεγονός που επομένως προκαλεί κάποια σύγχυση στη βιβλιογραφία. Ο όρος "κατάρρευση" (collapse) αναφέρεται αφενός στην τελική διάσπαση των διεπιφανειακών μονοστιβάδων που υπόκεινται σε ακραία συμπίεση, η οποία συνήθως συνεπάγεται μη αναστρέψιμες δομικές μεταβάσεις 2D–3D με την αποβολή υλικού από το διεπιφανειακό επίπεδο. Αυτή η

μη αναστρεψιμότητα θα μπορούσε εν μέρει να ευθύνεται για την εμφάνιση κάποιας υστέρησης στις ημι-στατικές (quasi-static) ισόθερμες διαστολές-συστολές, [3].



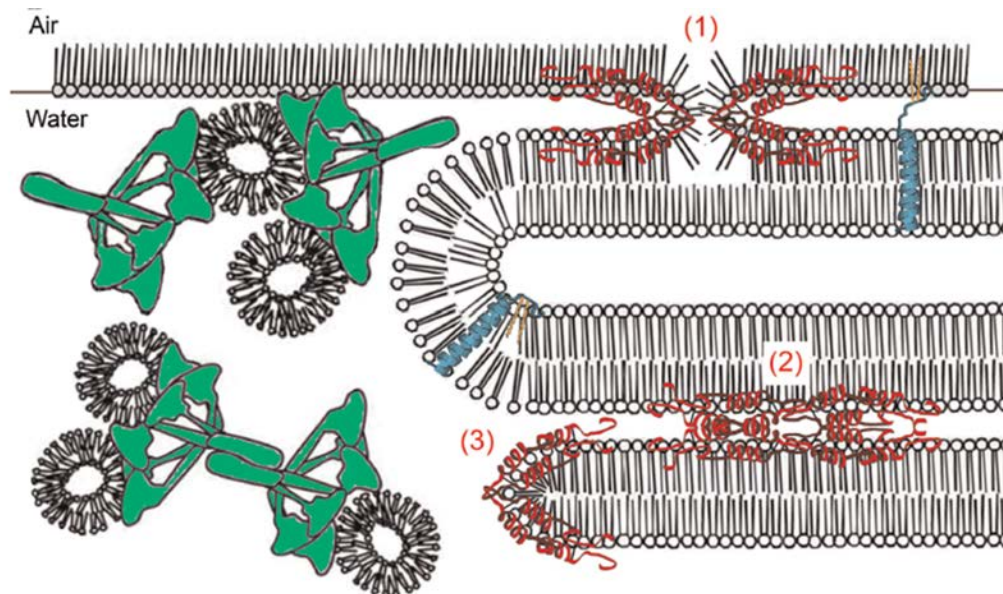
Σχήμα 3-2: Ισοθερμική συστολή-διαστολή από διεσπαρμένες διεπιφανειακές μεμβράνες διαφορετικής σύνθεσης σε επιφανειοκόμετρο δέσμησης φυσαλίδων στους 37°C: φυσικό επιφανειοδραστικό που λαμβάνεται από βρογχοκυψελιδικές πλύσεις πνευμόνων χοίρου, [3].

Από την άλλη πλευρά, ο όρος "κατάρρευση" (collapse) χρησιμοποιείται επίσης για την υγρο-κρυσταλλική κατάρρευση φυσικών ή επιφανειοδραστικών ουσιών μοντέλου, η οποία είναι μια αναστρέψιμη διαδικασία που αποτελείται από αναδίπλωση μιας στιβάδας από συγκεκριμένες θέσεις που οδηγεί στο σχηματισμό ομάδων διπλής στιβάδας ή πολλαπλών στρώσεων που εξυπηρετούν ως δεξαμενές επιφανειοδραστικών. Αυτός ο τύπος αναδίπλωσης μπορεί επίσης να σχηματιστεί από μονοστοιβάδες καθαρών λιπιδίων, ειδικά σε μείγματα που περιέχουν ακόρεστα είδη ή χοληστερόλη κατά την εφαρμογή σχετικά υψηλών επιφανειακών πιέσεων, αλλά σε αυτή την περίπτωση, η διαδικασία είναι μόνο εν μέρει αναστρέψιμη. Αντίθετα, η παρουσία επιφανειοδραστικών πρωτεϊνών SP-B και SP-C είναι απολύτως απαραίτητη για την ολική αναστρεψιμότητα (reversibility) αυτών των τρισδιάστατων δομών και συνεπώς για μια αποτελεσματική επαναδιασπορά της μεμβράνης, δημιουργώντας μια συνεχή πολυστρωματική μεμβράνη που μπορεί να αποκλειστεί εν μέρει από τη συστολή και να επανεισαχθεί κατά τη διαστολή. Η εκκίνηση αυτής της πρωτεϊνικής κατάρρευσης (εμφανίζεται σε περίπου 40 – 50 mN/m ανάλογα με τη λιπιδική σύνθεση) συμβαίνει σε χαμηλότερες επιφανειακές πιέσεις από τη μη αναστρέψιμη κατάρρευση για τις μεμβράνες DPPC (~70 – 72 mN/m), [41].

Η πραγματική εμφάνιση μιας τέτοιας μη αναστρέψιμης κατάρρευσης *in vivo* έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης, αλλά αυτό πιθανώς διαμορφώνεται λόγω της δράσης των πιο ελεγχόμενων τρισδιάστατων μεταβάσεων που προωθούνται από τις υδρόφοβες πρωτεΐνες. Έτσι, οι υδρόφοβες επιφανειοδραστικές πρωτεΐνες θα πρέπει να θεωρούνται ως καταλύτες, επιταχύνοντας τόσο την εισαγωγή επιφανειοδραστικών μορίων στη

μονοστιβάδα όσο και τις αποτελεσματικές και αναστρέψιμες αμφίδρομες μεταβάσεις 2D-3D. Μόλις δημιουργηθεί, η πολυστρωματική δεξαμενή φαίνεται να είναι σταθερά συνδεδεμένη με τη διεπιφανειακή μεμβράνη, κάτι που είναι επίσης πιθανό να οφείλεται στη δράση των επιφανειοδραστικών πρωτεϊνών. Το SP-B φαίνεται να προάγει τη δημιουργία μεγάλων επαφών μεμβράνης-μεμβράνης σε πολυστρωματικές δομές που, παρουσία διαχωρισμού φάσεων, εμφανίζουν υψηλή συνοχή, [43]. Το SP-C προκαλεί, σε υπερσυμπιεσμένες διεπιφανειακές μεμβράνες, τη δημιουργία πολλαπλών στρωμάτων που παραμένουν συνδεδεμένα με τη διεπιφανειακή μονοστιβάδα, [42]. Είναι πιθανό ότι μόνο το κύριο μέρος της πρωτεΐνης συστέλλεται έξω από τη διεπιφάνεια, και επιτρέπει τη στενή σύνδεση μεταξύ της μεμβράνης επιφανειοδραστικού και της δεξαμενής και εγγυάται την αναστρεψιμότητα (reversibility) του φιλμ επιφανειοδραστικού κατά το τέλος της συμπίεσης και κατά την εκκίνηση του επομένου αναπνευστικού κύκλου.

Ένα απλό μοντέλο για πολυστρωματικές δεξαμενές επιφανειοδραστικών (multilayer surfactant reservoirs) που σχετίζονται με τη διεπαφή αέρα-νερού απεικονίζεται στο Σχήμα 3-3, όπου οι πιθανοί ρόλοι των πρωτεϊνών επιφανειοδραστικού αναπαρίστανται σχηματικά. Το SP-A φαίνεται να προκαλεί συσσωμάτωση κυστιδίων και να ενισχύει την προσρόφηση. Ως αποτέλεσμα, θα μπορούσε να βοηθήσει στην προσρόφηση επιφανειοδραστικών μέσω της συγκόλλησης κυστιδίων δίπλα στη διεπιφάνεια. Τα SP-B και SP-C θα μπορούσαν να αποσταθεροποιήσουν τις δομές διπλής στιβάδας, σύμφωνα με τις διαπερατικές τους ιδιότητες και να διευκολύνουν την ανταλλαγή λιπιδίων μεταξύ των δομών της μεμβράνης.



Σχήμα 3-3: Μοντέλο για τις δεξαμενές επιφανειοδραστικών που σχετίζονται με τη διεπιφανειακή μονοστιβάδα, που δείχνει τους πιθανούς ρόλους των πρωτεϊνών επιφανειοδραστικών που σχετίζονται με τη μεμβράνη SP-A (πράσινο), SP-B (κόκκινο) και SP-C (μπλε) στον σχηματισμό τους, [3].

Το SP-B θα μπορούσε να δημιουργήσει συνδέσεις μεταξύ διπλών στρωμάτων ή μεταξύ μονοστιβάδων και διπλών στρωμάτων προκαλώντας τοπικό λύγισμα ή/και εγκαθιστώντας άμεσες επαφές πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, γεγονός που θα μείωνε την ενέργεια του σχηματισμού υποθετικά αρνητικών καμπυλωτών ενδιάμεσων (curved intermediates). Το SP-C φαίνεται να αποκλείεται από τη διεπαφή υπό υψηλή συστολή, αλλά η παλμιτοϋλίωση (palmitoylation) θα μπορούσε να λειτουργήσει ως άγκυρα με τη διεπιφανειακή μονοστιβάδα και να εξασφαλίσει τη σταθερή σύνδεση των δεξαμενών στη διεπαφή, [3].

Κεφάλαιο 4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι μέθοδοι για την αξιολόγηση της επιφανειακής δραστηριότητας του πνευμονικού επιφανειοδραστικού μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις κατηγορίες: τις *in vivo*, τις *in situ* και τις *in vitro* τεχνικές. Αρχικά γίνεται μια σύντομη αναφορά στις *in vivo* και στις *in situ*, και αναλύονται περαιτέρω οι *in vitro* τεχνικές καθώς συνιστούν την πλειοψηφία της ερευνητικής προσπάθειας που παρουσιάζεται στην βιβλιογραφία.

4.1 Μέθοδοι *in vivo*: δοκιμές, πειράματα και διαδικασίες σε ολόκληρο ζωντανό οργανισμό, όπως ένα άτομο, ένα ζώο εργαστηρίου ή ένα φυτό.

Έχουν αναπτυχθεί διάφορα μοντέλα *in vivo* για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας αποκατάστασης επιφανειοδραστικών σε πρόωρα και μη γεννημένα ζώα. Συνεπώς, τα *in vivo* μοντέλα που χρησιμοποιούνται συνήθως μπορούν γενικά να κατηγοριοποιηθούν σε εκείνα που αφορούν κυρίως ανεπάρκεια επιφανειοδραστικού, όπως το πρόωρο ζωικό μοντέλο και το μοντέλο πλύσης πνεύμονα με αλατούχο διάλυμα σε ενήλικα ζώα, και εκείνα που αφορούν κυρίως δυσλειτουργία ή αδρανοποίηση επιφανειοδραστικού, όπως η αναρρόφηση μηχανίου (*meconium aspiration*), μοντέλα αερισμού υψηλής τάσης (*high-stretch ventilation*) και όξινης αναρρόφησης (*acid aspiration*), [44], [45]. Ο γενικός στόχος των τελευταίων μοντέλων είναι η διερεύνηση της θεραπευτικής δυνατότητας για τη συγκεκριμένη πνευμονική βλάβη, παρά την εξέταση των βιοφυσικών ιδιοτήτων *in vivo*.

Η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της επιφανειοδραστικής ουσίας σε πρόωρα ζώα έχει πραγματοποιηθεί κυρίως με πρόωρα κουνέλια, [46], [47], [48], [49]. Σε αυτά τα πειράματα τα έμβρυα κουνελιών γεννιούνται με καισαρική τομή σε ηλικία κύησης 27 ή 28 ημερών, οπότε οι πνεύμονες εξακολουθούν να έχουν έλλειψη επιφανειοδραστικού. Τα πρόωρα κουνέλια συνδέονται με έναν αναπνευστήρα ελεγχόμενης πίεσης σε μια διάταξη πληθυσμογραφίας (*plethysmography*) 37°C στην οποία η μέγιστη πίεση στην οποία αερίζεται κάθε κουνέλι μπορεί να ελεγχθεί ξεχωριστά, [10]. Το επιφανειοδραστικό μπορεί

να χορηγηθεί απευθείας στους πνεύμονες των ζώων μέσω μιας ένεσης σε συγκεκριμένο διάστημα μέσω ενός ενδοτραχειακού σωλήνα. Το κύριο αποτέλεσμα της του επιφανειοδραστικού σε αυτό το μοντέλο είναι η δυναμική συμμόρφωση των πνευμόνων κατά τον αερισμό.

Ένα δεύτερο μοντέλο πρόωρου ζώου που έχει χρησιμοποιηθεί είναι αυτό του πρόωρου αρνιού, [50], [51]. Αν και εννοιολογικά είναι παρόμοιο με το μοντέλο πρόωρου κουνελιού, αυτό το μοντέλο έχει το πλεονέκτημα του μεγαλύτερου μεγέθους ζώου που μιμείται περισσότερο τα χαρακτηριστικά του πρόωρο βρέφους που παρατηρείται στο σύνδρομο αναπνευστικής ανεπάρκειας (Respiratory Distress Syndrome – RDS). Αυτό το μοντέλο επιτρέπει πιο εκτεταμένες μετρήσεις σχετικά με τα αέρια του αίματος, την κατανομή των επιφανειοδραστικών ουσιών και τον μεταβολισμό. Από την άλλη πλευρά, το μοντέλο του πρόωρου αρνιού απαιτεί περισσότερη εργασία και είναι πιο ακριβό. Γενικά, αυτό το μοντέλο είναι κατάλληλο για εκτενέστερες προκλινικές μελέτες για εξωγενείς επιφανειοδραστικές θεραπείες.

Γενικά, οι περισσότερες *in vivo* μελέτες που εξετάζουν τη δράση του επιφανειοδραστικού έχουν επιβεβαιώσει τα προηγούμενα *in vitro* δεδομένα. Για παράδειγμα, η *in vitro* ανάλυση της βιοφυσικής δραστηριότητας των διαφορετικών υποκλασμάτων επιφανειοδραστικών, δηλ. των μεγάλων συσσωματωμάτων (ελασματικά σώματα, πολυστρωματικά κυστίδια, σωληνοειδής μυελίνη) και μικρά συσσωματώματα (μικρά μονοστρωματικά κυστίδια), έδειξε ότι τα μεγάλα συσσωματώματα αντιπροσώπευαν το λειτουργικό συστατικό του επιφανειοδραστικού, [52]. Αυτό στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε *in vivo* χρησιμοποιώντας τόσο το μοντέλο του πρόωρου κουνελιού όσο και το μοντέλο πλύσης πνεύμονα σε ποντίκια, [48], [53]. Σε μια άλλη μελέτη οι Bailey et al. χρησιμοποίησαν ποντίκια που είχαν πλυθεί τα πνευμόνια τους για να συγκρίνουν τις φυσιολογικές αποκρίσεις σε ένα εξωγενές επιφανειοδραστικό με και χωρίς έκθεση σε οξείδωση. Αυτή η μελέτη επιβεβαίωσε προηγούμενα *in vitro* δεδομένα που είχαν δείξει ότι η οξείδωση βλάπτει τη λειτουργία του επιφανειοδραστικού. Ωστόσο, είναι σημαντικό ότι δεν συσχετίζονται όλες οι *in vivo* μελέτες με την *in vitro* βιοφυσική δραστηριότητα. Για παράδειγμα, ως μέρος της μελέτης που αναφέρθηκε παραπάνω, οι Bailey et al. διαπίστωσαν ότι το SP-A βελτίωσε επιπλέον τη βιοφυσική δραστηριότητα του οξειδωμένου εξωγενούς επιφανειοδραστικού *in vitro*, αλλά αυτός ο συνδυασμός δεν ήταν τόσο αποτελεσματικός όσο το εξωγενές επιφανειοδραστικό ελέγχου *in vivo*, [11]. Επίσης, με

βάση έρευνες στις οποίες η προσθήκη πολυαιθυλενογλυκόλης (Polyethylene Glycol – PEG) σε επιφανειοδραστικό ήταν ικανή να βελτιώσει τις ιδιότητες εξωγενούς επιφανειοδραστικού *in vitro*, οι Campbell et al., [12], διερεύνησαν αυτό στο μοντέλο κουνελιού με πλύση πνεύμονα. Σε αντίθεση με τα δεδομένα *in vitro*, τα ζώα που έλαβαν επιφανειοδραστικό με PEG είχαν κατώτερη φυσιολογική απόκριση σε σύγκριση με τα ζώα που έλαβαν μόνο επιφανειοδραστικό, [10].

4.2 Μέθοδοι *in situ*

Δύο *in situ* μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την εκτίμηση του κυψελιδικής επιφανειακής τάσης σ σε αποκομμένους πνεύμονες. Η μία είναι η μέθοδος πίεσης-όγκου (Pressure – Volume – P-V) που χρησιμοποιήθηκε αρχικά στην πρώιμη ανακάλυψη της σημασίας των δυνάμεων επιφανειακής τάσης. Αυτή η μέθοδος καθορίζει έμμεσα την επιφανειακή τάση αναλύοντας ισόθερμες καμπύλες P-V των αποκομμένων πνευμόνων που συστέλλονται/διαστέλλονται με σχεδόν στατικό τρόπο. Η αρχή αυτής της μεθόδου είναι η εξής: η εισπνοή ή η διατήρηση των πνευμόνων σε σταθερό όγκο με αέρα απαιτεί εργασία τόσο ενάντια στις δυνάμεις των ιστών όσο και στις δυνάμεις επιφανειακής τάσης. Με το γέμισμα των πνευμόνων με αλατούχο διάλυμα εξαφανίζεται η διεπαφή αέρα-υγρού, αφήνοντας έτσι μόνο τις δυνάμεις του πνευμονικού ιστού. Ως εκ τούτου, η διαφορά μεταξύ των ισόθερμων P-V των πνευμόνων γεμισμένων με αέρα και αλατούχου διαλύματος αντανακλά τη συμβολή των δυνάμεων σ . Στην πράξη, αυτή η διαδικασία περιπλέκεται από την ανάγκη να αποβληθεί όλος ο αέρας από τους πνεύμονες. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί επιτρέποντας στους πνεύμονες να καταρρεύσουν πλήρως. Για παράδειγμα, μπορεί να υποβοηθηθεί από προσθήκη καθαρού O_2 το οποίο, σε αντίθεση με τον αέρα που περιέχει N_2 , μπορεί να απορροφηθεί πλήρως από τα αγγεία.

Μια άλλη μέθοδος *in situ* είναι η τεχνική μικροσταγονιδίων (microdroplet technique) που αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τον Schurch και τους συνεργάτες του τη δεκαετία του 1970, [13]. Αυτή είναι μέχρι στιγμής η μόνη μέθοδος που είναι πραγματικά ικανή για την άμεση μέτρηση της επιφανειακής τάσης στον πνεύμονα. Με αυτή τη μέθοδο, ένα σταγονίδιο ενός μη-αναμίξιμου με το νερό υγρού (π.χ., φθοράνθρακα) με γνωστή την τιμή της σ εναποτίθεται στην κυψελιδική επιφάνεια των αποκομμένων πνευμόνων χρησιμοποιώντας ένα micropipette. Το σταγονίδιο εξαπλώνεται στο επιφανειοδραστικό στρώμα επένδυσης των κυψελίδων για να σχηματίσει έναν υγρό λεπτό φακό. Θεωρητικά,

το σχήμα ισορροπίας αυτού του φακού (η γωνία επαφής του) καθορίζεται από την ισορροπία δυνάμεων επιφανειακής τάσης στην διεπαφή υγρού αέρα-φακού, του στρώματος αέρα-επένδυσης και των διεπαφών στρώματος υγρού-επενδυτικού φακού. Για αυτό το λόγο, το σχήμα του υγρού φακού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση του σ του επιφανειοδραστικού στρώματος επένδυσης. Στην πράξη, το σ υπολογίζεται από τη διάμετρο του υγρού φακού, παρακολουθούμενο με μικροσκόπιο. Μια καμπύλη βαθμονόμησης (σ vs. της διαμέτρου του φακού) για το μη αναμίξιμο υγρό προσδιορίζεται σε ένα ξεχωριστό πείραμα *in vitro* χρησιμοποιώντας την ισορροπία Langmuir. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι αυτή η διαδικασία βαθμονόμησης μπορεί να εισάγει σφάλματα στις *in situ* μετρήσεις, [54]. Αυτό συμβαίνει επειδή το σχήμα και η διάμετρος του υγρού φακού καθορίζονται από την ισορροπία της επιφανειακής τάσης μόνο για μια αρκετά βαθιά υποφάση (subphase). Εάν το πάχος της υποφάσης είναι παρόμοιο με το βάθος διείσδυσης του υγρού φακού, ο φακός μπορεί να παραμορφωθεί σημαντικά από μια αποσυνδεδεμένη πίεση. Κατά συνέπεια, η καμπύλη γ-διαμέτρου βαθμονομημένη με ισορροπία Langmuir, με μακροσκοπική υποφάση, θα μπορούσε να αποκλίνει από την *in vivo* κατάσταση, όπου η υδατική υποφάση των κυψελίδων είναι εξαιρετικά λεπτή.

Η μέθοδος μικροσταγονιδίων έχει επίσης εφαρμοστεί με επιτυχία για τη μέτρηση του σ *in vivo*, για παράδειγμα, στην τραχεία των μη αναισθητοποιημένων αλόγων, [10], [55].

4.3 Μέθοδοι *in vitro*

Λόγω της ευκολίας τους, οι μέθοδοι *in vitro* χρησιμοποιούνται πιο συχνά για την εξέταση της επιφανειακής δραστηριότητας του πνευμονικού επιφανειοδραστικού. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές. Τρεις ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι είναι η ισορροπία Langmuir-Wilhelmy, η Pulsating Bubble Surfactometer και η Captive Bubble Surfactometer. Εκτός από αυτές τις τρεις μεθόδους, οι μέθοδοι Constrained Sessile Drop και Constrained Drop Surfactometry αναπτύχθηκαν πιο πρόσφατα για την *in vitro* αξιολόγηση του πνευμονικού επιφανειοδραστικού. Αυτές οι πέντε μέθοδοι θα συζητηθούν εκτενώς και θα συγκριθούν. Θα εισαχθούν επίσης και άλλες μέθοδοι *in vitro*, λιγότερο λεπτομερώς.

4.3.1 Ισορροπία Langmuir-Wilhelmy

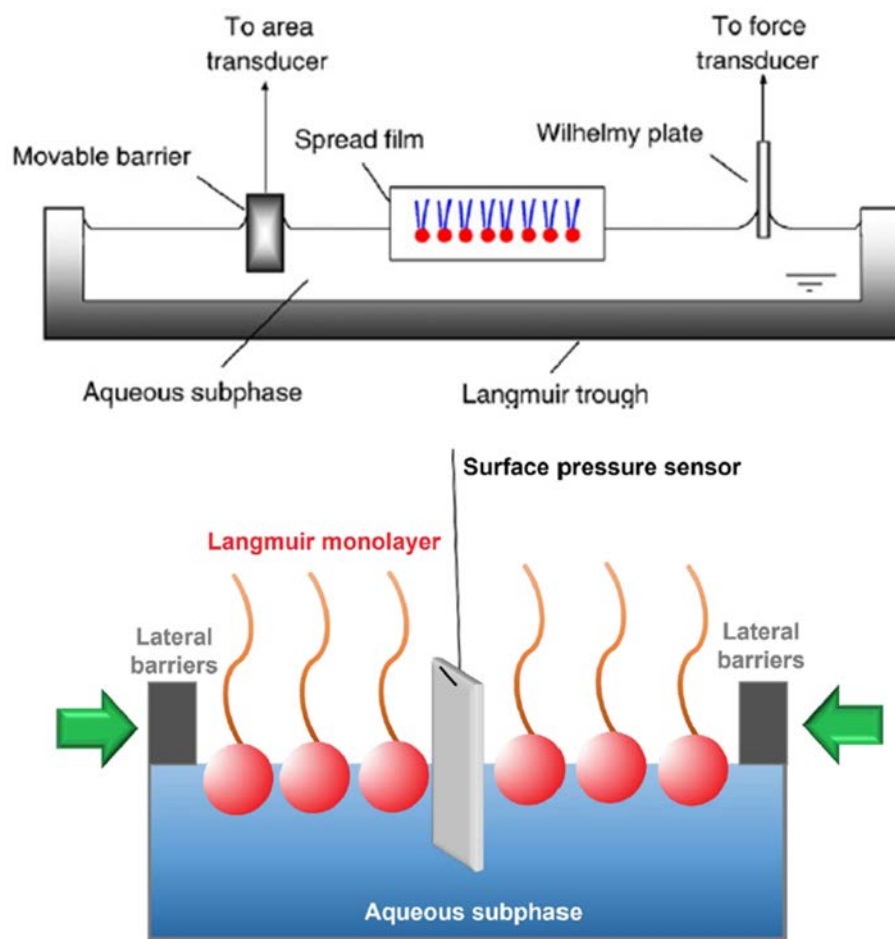
Η κλασικό μοντέλο ισορροπίας Langmuir εισήχθη στην επιστήμη επιφανειών στα πρώτα χρόνια του 20ου αιώνα. Μια αδιάλυτη μονοστιβάδα επιφανειοδραστικής ουσίας, συνήθως σε οργανικό διαλύτη, απλώνεται πάνω από μια υγρή υποφάση, συνήθως υδατική, γεμίζοντας μια υποδοχή. Η μεμβράνη ορίζεται από δύο φράγματα που κινούνται συμμετρικά ή από ένα σταθερό στη μία πλευρά και ένα κινητό στην άλλη πλευρά. Αυτό φαίνεται στο Σχήμα 4-1.

Η μεμβράνη μπορεί να συμπιεστεί αργά και να επεκταθεί με σχεδόν στατικό τρόπο από τη σχετική κίνηση των δύο φραγμάτων. Η δύναμη που επενεργεί στο αιωρούμενο φράγμα μετριέται από έναν οριζόντιο μετατροπέα δύναμης, ο οποίος εμφανίζει την επιφανειακή πίεση Π . Η επιφανειακή πίεση συνδέεται με την επιφανειακή τάση μιας επιφάνειας επικαλυμμένης με επιφανειοδραστικό με την εξίσωση $\Pi = \sigma_0 - \sigma$, όπου σ_0 είναι η επιφανειακή τάση της επιφάνειας χωρίς επιφανειοδραστικού και σ είναι η επιφανειακή τάση λόγω της επικάλυψης με επιφανειοδραστική ουσία. Για τη διεπιφάνεια αέρα νερού $\sigma_0 = 70 \text{ mN/m}$ στους 37° , η οποία θεωρείται η φυσιολογική θερμοκρασία και χρησιμοποιείται σε in-vitro μεθόδους, [3], [40]. Η επιφανειακή τάση μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση του Wilhelmy, [56]:

$$\sigma = \frac{F}{l \cos\theta}$$

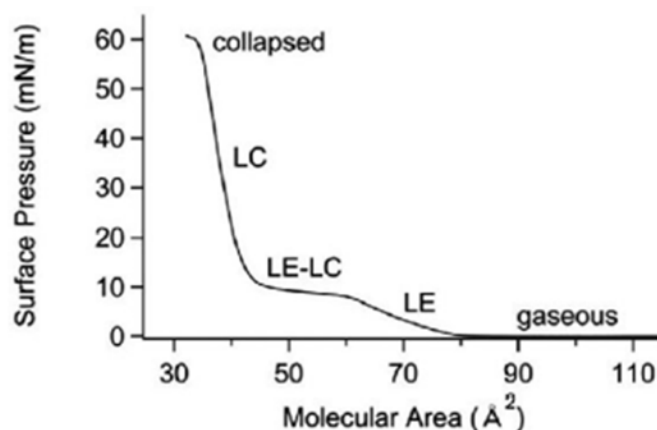
όπου F είναι που ασκεί το υγρό στην μέσω της διεπιφάνειας, l είναι η συνολική περίμετρος διαβροχής υγρού και πλάκας, αγνοώντας την άνωση της πλάκας σε επαφή με το νερό, και θ είναι η γωνία επαφής μεταξύ της υδατικής φάσης και της πλάκας Wilhelmy.

Ο Clements, [14], τροποποίησε το αρχικό σχέδιο του Langmuir για να εισαγάγει την ισορροπία Langmuir–Wilhelmy (Langmuir–Wilhelmy Balance – LWB) στη μελέτη του πνευμονικού επιφανειοδραστικού. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4-1, η LWB αποτελείται από μια υποδοχή Langmuir κατασκευασμένη από τεφλόν και μια πλάκα Wilhelmy για τη μέτρηση του σ της καλυμμένης με επιφανειοδραστικό υποφάσης.

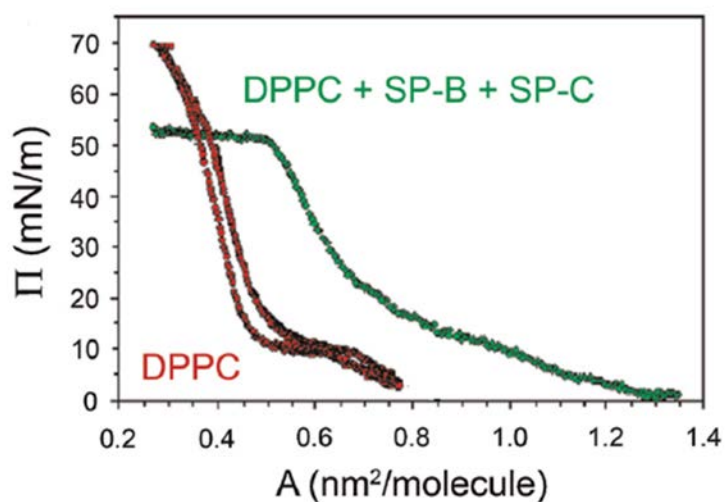


Σχήμα 4-1: Σχηματική αναπαράσταση ισορροπίας Langmuir–Wilhelmy, [10],[88].

Αυτή η πρώιμη πιεστική συσκευή αποτελεί όχι μόνο εκκίνηση για μια εικονική ανάταση στην έρευνα επιφανειοδραστικών, αλλά παραμένει επίσης δημοφιλής μέχρι και σήμερα. Η LWB είναι κατάλληλη για την ισόθερμων καμπυλών $\Gamma - A$ των διασκορπισμένων μονοστιβάδων, καθώς η επιφάνεια ανά μόριο μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια ελέγχοντας την ποσότητα της επιφανειοδραστικής ουσίας και την επιφάνεια που είναι διαθέσιμη για διασπορά. Το πνευμονικό επιφανειοδραστικό παραμένει πρακτικά αδιάλυτο στο νερό εξαιτίας του χαμηλού CMC των φωσφολιπιδίων από τα οποία αποτελείται, [57], επομένως κατά την διασπορά πνευμονικού επιφανειοδραστικού στη διεπιφάνεια σχηματίζεται μια διεπιφάνεια Langmuir (Langmuir monolayer) και η ποσότητα των μορίων παραμένει σταθερή. Συμβολίζοντας με Γ την συγκέντρωση τους σε mol/m^2 , είναι $\Gamma = 1/A_\mu$ όπου A_μ είναι η μέση επιφάνεια ανά προσροφηθέν μόριο επιφανειοδραστικού. Μια τυπική ισόθερμος Π -A φαίνεται στο Σχήμα 4-2, το οποίο έχει παραχθεί με την μέθοδο Langmuir για το φωσφολιπίδιο DPPC.



Σχήμα 4-2: Ισόθερμη επιφάνειας πίεσης-περιοχής για το DPPC που δείχνει τις διαδιάστατες φάσεις του και η οριζόντια-plateau που αντιπροσωπεύει τη συνύπαρξη των φάσεων LE-LC, [56].



Σχήμα 4-3: Επίδραση των SP-B, SP-C σε ισόθερμες DPPC [56].

Οι ισόθερμες $\Pi - A$ είναι ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο για τον χαρακτηρισμό των επιφανειακών ρεολογικών ιδιοτήτων μεμονωμένων συστατικών του πνευμονικού επιφανειοδραστικού και των μειγμάτων τους, όπως διαπιστώνεται στο Σχήμα 4-3, όπου φαίνεται διακριτά η επίδραση της προσθήκης SP-B, SP-C σε μονοστοιβάδες DPPC. Ένα άλλο πρωταρχικό πλεονέκτημα της LWB είναι η δυνατότητα εύκολου συνδυασμού με μια ποικιλία μικροσκοπικών και φασματοσκοπικών τεχνικών, οι οποίες δεν επιδέχονται εύκολα τις άλλες *in vitro* μεθόδους. Τέτοιοι συνδυασμοί επιτρέπουν την άμεση εξέταση της μοριακής δομής, του προσανατολισμού, του σχηματισμού πεδίου, της τοπογραφίας, του ηλεκτρικού δυναμικού επιφάνειας και της τοπικής χημικής σύνθεσης είτε των μεμβρανών στη διεπαφή αέρα-νερού είτε των μεμβρανών που μεταφέρονται σε στερεό υπόστρωμα

(substrate) χρησιμοποιώντας την τεχνική Langmuir-Blodgett. Η LWB έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με το μικροσκόπιο γωνίας Brewster, το μικροσκόπιο φθορισμού, το ομοεστιακό μικροσκόπιο, τη σάρωση κοντινού πεδίου, τη μικροσκοπία δύναμης ατόμου (Atomic Force Microscopy – AFM), την περίθλαση ακτίνων Χ με παράλληλη πρόσπτωση, τη φασματοσκοπία υπέρυθρης ακτινοβολίας, τη φασματοσκοπία δημιουργίας αθροίσματος συχνότητας και το ToF-SIMS. Η εφαρμογή αυτών των τεχνικών απεικόνισης/ανάλυσης μεμβράνης σε μελέτες πνευμονικού επιφανειοδραστικού έχει παράσχει πολύτιμες πληροφορίες που συμπληρώνουν τις παραδοσιακές τεχνικές τενσιομετρίας.

Παρά τα παραπάνω πλεονεκτήματα, η LWB έχει μια σειρά από μειονεκτήματα για τη μελέτη του πνευμονικού επιφανειοδραστικού. Πρώτον, δεν είναι ιδανικό για τη μελέτη της προσρόφησης επιφανειοδραστικού από την υποφάση, καθώς απαιτεί σχετικά μεγάλη ποσότητα υγρού δείγματος, δηλαδή συνήθως όχι λιγότερο από αρκετές δεκάδες χιλιοστόλιτρα. Δεύτερον, η LWB επιτρέπει μόνο σχετικά αργούς κύκλους συμπίεσης-διαστολής, καθώς ο γρήγορος κύκλος δημιουργεί κύματα στη διεπαφή αέρα-νερού, τα οποία παρεμβαίνουν στη μέτρηση του σ . Μαζί με τις δυσκολίες στον ακριβή έλεγχο της φυσιολογικής θερμοκρασίας και υγρασίας, η LWB δεν προσομοιώνει άμεσα την αναπνοή. Τρίτον, μπορεί να υπάρχει πρόβλημα με την ακρίβεια μέτρησης της πλάκας Wilhelmy καθώς απαιτεί γωνία επαφής 0° μεταξύ της κατακόρυφης βυθιζόμενης πλάκας και του προσκολλημένου στρώματος ρευστού. Αυτή η κατάσταση μπορεί να είναι δύσκολο να διατηρηθεί, ειδικά κατά τη διάρκεια της διαστολής του φιλμ, καθώς τα μόρια φωσφολιπιδίων τείνουν να προσροφηθούν στην πλάκα κατά τη διάρκεια της προηγούμενης συμπίεσης του φιλμ. Αν και αυτές οι ανησυχίες μπορούν να ξεπεραστούν, καθιστούν την LWB μια συσκευή δύσκολο για να λειτουργεί με ακρίβεια. Τέλος, ένα λιγότερο προφανές αλλά σοβαρό πρόβλημα, είναι ότι η LWB μπορεί να υποφέρει από το φαινόμενο γνωστό ως "διαρροή μεμβράνης" (film leakage). Η διαρροή μεμβράνης οφείλεται στη θερμοδυναμική: σε αρκετά χαμηλό σ , το επιφανειακά ενεργό υλικό τείνει να εξαπλωθεί από τη διεπιφάνεια αέρα-νερού στο στερεό πλαίσιο που υποστηρίζει τη μεμβράνη, π.χ. κατά τη διαβροχή των στερεών φραγμάτων και των τοίχων, καθώς αυτή η διαδικασία μειώνει τη συνολική ελεύθερη ενέργεια του συστήματος. Η διαρροή φωσφολιπιδίων στην επιφάνεια αέρα-τεφλόν ξεκινά συνήθως από $\sigma \sim 18 \text{ mN/m}$, [15], [58]. Λόγω της απώλειας του υλικού της μεμβράνης από τη διεπαφή αέρα-νερού, η φαινομενική μοριακή περιοχή και η αναλογία συμπίεσης της μεμβράνης μπορεί να είναι λανθασμένες. Επίσης, λόγω της διαρροής

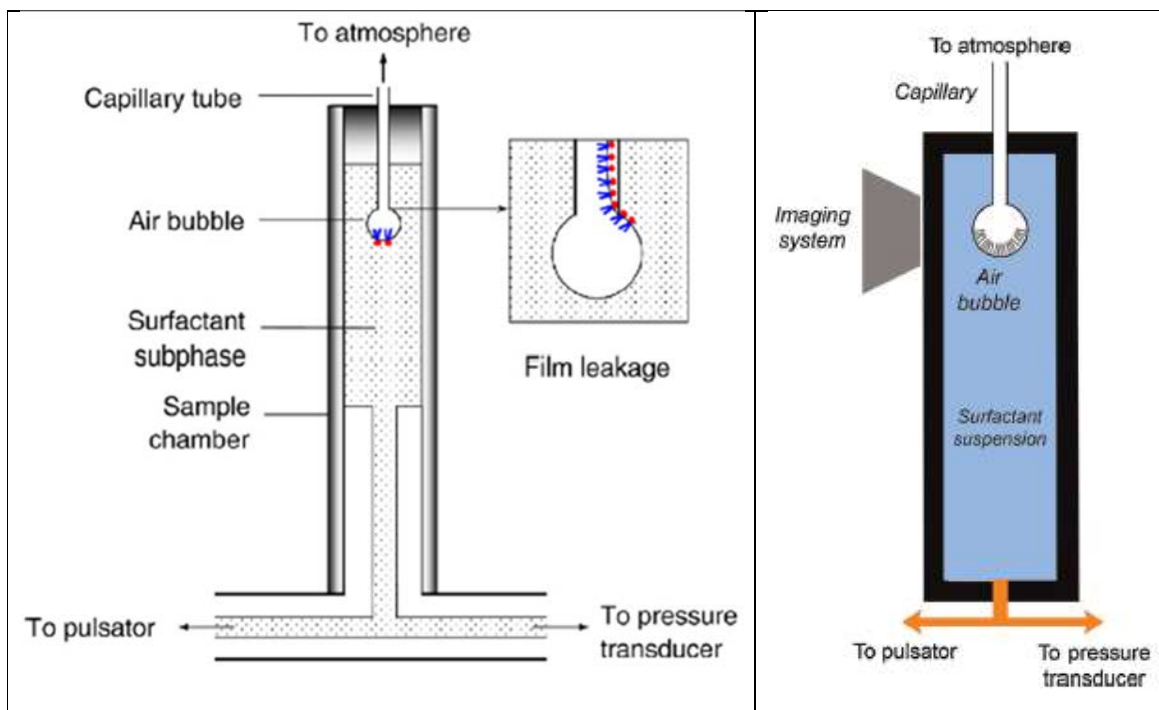
μεμβράνης, η ικανότητα επίτευξης πολύ χαμηλής σ , όπως συμβαίνει κατά την αναπνοή, μπορεί να μην μπορεί να είναι εφικτή, [15].

Με την LWB, η διαρροή μεμβράνης μπορεί να συμβεί τόσο στα τοιχώματα της υποδοχής όσο και στα φράγματα, είτε πάνω από τη στάθμη του νερού (στη διεπαφή αέρα-στερεού) είτε κάτω από τη στάθμη του νερού (στη διεπαφή υγρού-στερεού). Η διαρροή στα φράγματα μπορεί να μειωθεί χρησιμοποιώντας σφιχτά τοποθετημένα φράγματα ή συνεχείς κορδέλες από τεφλόν. Η διαρροή στα τοιχώματα της υποδοχής μπορεί να μειωθεί με αστάρωμα των τοιχωμάτων από τεφλόν με αλκοολούχο διάλυμα χλωριούχου λανθανίου και κορεσμένης φωσφατιδυλοχολίνης μακράς αλυσίδας (long-chain saturated phosphatidylcholine). Χρησιμοποιώντας αυτές τις λύσεις, μπορεί να επιτευχθεί σχεδόν μηδενικό σ με ακραία συμπίεση της μεμβράνης. Ένα σταθερό π , ωστόσο, μπορεί κανονικά να διατηρηθεί μόνο με προοδευτική συμπίεση της μεμβράνης, αποδεικνύοντας ότι η LWB αποτυγχάνει να αναπαράγει την εξαιρετική σταθερότητα της μεμβράνης που βρίσκεται *in situ*. Τα προβλήματα στη σταθερότητα της μεμβράνης είναι ιδιαίτερα εμφανή στη φυσιολογική θερμοκρασία και υγρασία, [10], [16]. Επίσης, είναι ευρέως αποδεκτό ότι το μοντέλο μονοστιβάδας Langmuir δεν είναι ικανό να προσομοιώσει την εξαιρετικά δυναμική βιοφυσική ανισορροπία της απορροφημένης μεμβράνης πνευμονικού επιφανειοδραστικού κάτω από φυσιολογικά σχετικές συνθήκες, [37].

4.3.2 Pulsating Bubble Surfactometer

Η μέθοδος Pulsating Bubble Surfactometer (PBS) εισήχθη για πρώτη φορά από τον Enhorning το 1977, [17]. Η εν λόγω μέθοδος μιμείται την εγγενή γεωμετρία των κυψελίδων και τις δυναμικές συνθήκες της αναπνοής. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4-4, το επί του παρόντος διαθέσιμο στο εμπόριο PBS αποτελείται από μια φυσαλίδα αέρα που σχηματίζεται σε ένα θάλαμο πολυακρυλαμιδίου μιας χρήσης. Ο θάλαμος περιέχει μόνο 20μL του υγρού δοκιμής και βυθίζεται σε λουτρό ελεγχόμενης θερμοκρασίας. Η φυσαλίδα σχηματίζεται αντλώντας αέρα από την ατμόσφαιρα μέσω ενός τριχοειδούς (μοντέλο φυσαλίδων σε σωλήνα). Η προσρόφηση παρακολουθείται για 10 secs. Στη συνέχεια, η φυσαλίδα ταλαντώνεται από έναν παλμικό μηχανισμό μεταξύ δύο σταθερών θέσεων: της ελάχιστης ακτίνας 0,4 mm και της μέγιστης ακτίνας 0,55 mm, η οποία προκαλεί μέγιστη μείωση της επιφάνειας κατά 50%. Η συχνότητα που χρησιμοποιείται συνήθως είναι 20

κύκλοι/ λεπτό για να μιμηθεί την αναπνοή. Ωστόσο, αυτό μπορεί να αλλάξει από 0,02 σε 80 κύκλους/λεπτό, [10].



Σχήμα 4-4: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου pulsating bubble surfactometer, [3], [10].

Κατά τη διάρκεια της ταλάντωσης, η μέγιστη και η ελάχιστη ακτίνα (R) της φυσαλίδας παρακολουθούνται με μικροσκόπιο. Η διαβάθμιση της πίεσης κατά μήκος της φυσαλίδας (ΔP) μετράται από έναν μετατροπέα πίεσης. Δεδομένου ότι η φυσαλίδα επικοινωνεί με την ατμόσφαιρα του περιβάλλοντος, η διαβάθμιση πίεσης που μετράται από τον μετατροπέα αντιστοιχεί στην αρνητική πίεση σε όλη την υγρή φάση. Το σ υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την εξίσωση Laplace για μια σφαιρική διεπαφή, [10]:

$$\Delta P = \frac{2\sigma}{R} \quad \text{Εξίσωση 1}$$

Η εξίσωση 1, γνωστή και ως Laplace law χρησιμοποιείται και ως ένα απλό μοντέλο κυψελίδας σφαιρικής γεωμετρίας όπου σ η επιφανειακή τάση του υγρού, R η ακτίνα η οποία είναι $\sim 100 \mu m$ και Δp η απαιτούμενη πίεση για την διαστολή της κυψελίδας, [59].

Η PBS είναι εξαιρετικά αποδοτική αλλά και χρονικά. Μία μέτρηση μπορεί να ολοκληρωθεί μέσα σε 5 λεπτά και χρειάζεται μόνο $\sim 20 \mu L$ δείγματος, [10]. Για αυτό το λόγο, η PBS έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον ποιοτικό έλεγχο των κλινικών επιφανειοδραστικών. Επιπλέον, είναι εξαιρετικά χρήσιμη για την παρακολούθηση και τη σύγκριση της επιφανειακής δραστηριότητας διαφορετικών δειγμάτων επιφανειοδραστικών

όταν παράγονται πολλά ζωικά ή κλινικά δείγματα. Η ταχεία προσρόφηση κατά τη διάρκεια της διαστολής υποδεικνύεται από το σ της μεμβράνης στη μέγιστη ακτίνα φυσαλίδων και η ικανότητα να φτάσει στο χαμηλό σ εξετάζεται όταν η μεμβράνη συμπιέζεται στην ελάχιστη ακτίνα φυσαλίδων. Ένα άλλο πλεονέκτημα της PBS, που την καθιστά ανώτερο από την LWB, είναι ο γρήγορος παλμικός ρυθμός που επιτρέπει την άμεση προσομοίωση της αναπνοής.

Ωστόσο, η PBS έχει ορισμένα μειονεκτήματα. Πρώτον, για διάφορους λόγους, η διαρροή είναι ένα σοβαρό πρόβλημα. Σε χαμηλό σ , η διαρροή μπορεί να συμβεί τόσο στην εσωτερική επιφάνεια (αέρας-στερεό) όσο και στην εξωτερική επιφάνεια (υγρό-στερεό) του τριχοειδούς. Η πρώτη μέθοδος PBS που αναφέρθηκε από τον Enhorning, [17], χρησιμοποιούσε οικιακούς θαλάμους με τριχοειδές τεφλόν που μείωσε τη διαρροή στη διεπαφή αέρα-στερεού. Με τον συγκεκριμένο θάλαμο πολυακρυλαμιδίου, μια λεπτή μεμβράνη νερού μπορεί να συγκρατηθεί μέσα στο τριχοειδές όταν σχηματίζεται η φυσαλίδα, οδηγώντας έτσι σε μια πολύ μεγαλύτερη επιφάνεια μεμβράνης από την αναμενόμενη. Κατά τη διάρκεια του παλμού, η μεμβράνη νερού μπορεί να αποστραγγιστεί από το τριχοειδές αλλά αυτό μπορεί να είναι μεταβλητό. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες του πλάσματος μπορούν να προσροφηθούν στο τριχοειδές κατά το σχηματισμό φυσαλίδων και οι πρωτεΐνες, όντας υδρόφιλες, να συγκρατούν νερό, εμποδίζοντας έτσι την αποστράγγιση. Ως εκ τούτου, είναι ιδιαίτερα προβληματικό με μελέτες αναστολής επιφανειοδραστικών από πρωτεΐνες πλάσματος όπου οι εμφανείς επιβλαβείς επιδράσεις αυτών των πρωτεϊνών μπορούν να αυξηθούν στην PBS λόγω διαρροής. Επίσης λόγω διαρροής, η PBS δεν είναι κατάλληλη για τη μελέτη της σταθερότητας της μεμβράνης σε σ_{min} σε μη παλμική λειτουργία.

Ένα δεύτερο πρόβλημα με τη συσκευή της μέθοδο PBS που είναι διαθέσιμη στο εμπόριο, είναι η έλλειψη ευελιξίας στην αξιολόγηση της επιφανειακής δραστηριότητας. Για παράδειγμα, ο χρόνος για την προσρόφηση στην ισορροπία ορίζεται στα 10 δευτερόλεπτα. Αν και αυτό μπορεί να αλλάξει, δεν μπορεί να γίνει εύκολα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα ζωικά και κλινικά δείγματα να υπόκεινται σε διαστολή και συστολή, συχνά πριν επιτευχθεί το σ_{eq} . Αυτό προφανώς έχει αντίκτυπο στο σ_{min} και στο σ_{max} , καθώς και στο σ_{eq} που καταγράφηκε για το συγκεκριμένο δείγμα. Η επιμήκυνση του χρόνου προσρόφησης θα βοηθούσε επίσης στην ελαχιστοποίηση της ποσότητας του νερού που παραμένει μέσα στο τριχοειδές και επομένως της διαρροής της μεμβράνης. Επιπλέον, ο τρόπος με τον οποίο λειτουργεί η τρέχουσα εμπορική συσκευή είναι να εκκινεί παλμούς επεκτείνοντας τη

φυσαλίδα από την ελάχιστη ακτίνα στο τέλος της περιόδου προσρόφησης των 10 δευτερολέπτων. Έτσι, ακόμα κι αν το δείγμα έχει επιτύχει το σ_{eq} , ένα επιπλέον 50% της επιφάνειας συμπιέζεται σε 1,5 s (για παλμό με 20 κύκλους/λεπτό), καθιστώντας αδύνατη τη συσχέτιση της έναρξης συμπίεσης με το σ_{eq} , [10]. Επιπλέον, αν και είναι δυνατή η πρόσβαση σε πρόσθετες πληροφορίες, η συσκευή PBS συνήθως καταγράφει μόνο το σ της φυσαλίδας στη μέγιστη και την ελάχιστη ακτίνα, ώστε να είναι το σ_{max} και το σ_{min} , σε παλμική λειτουργία. Η μέγιστη μείωση της επιφάνειας των φυσαλίδων, δηλαδή ο λόγος συμπίεσης, καθορίζεται στο 50%, γεγονός που εμποδίζει τη λεπτομερή μελέτη της ρεολογίας της επιφάνειας.

Τέλος, οι μετρήσεις σ σε χαμηλές τιμές χρησιμοποιώντας την Εξίσωση 1 δεν είναι αξιόπιστες. Ακόμη και για μια μικρή φυσαλίδα μικρότερη από 1 μL ($\sim 1\text{ mm}$ σε διάμετρο), η υπόθεση του σφαιρικού σχήματος δεν ισχύει όταν το σ πέφτει σε τιμές κοντά στο 1 mN/m, [60]. Η επίδραση της βαρύτητας στην παραμόρφωση των φυσαλίδων σε χαμηλό σ και άλλες επιδράσεις της αλλαγής του σχήματος της φυσαλίδας, όπως τα υδροδυναμικά φαινόμενα λόγω της ταχείας παλμικής κίνησης, έχουν μελετηθεί εκτενώς από τον Franses et al., [18]. Ωστόσο, πρέπει να τονιστεί ότι στις περισσότερες περιπτώσεις όπου αυτή η συσκευή χρησιμοποιείται για τη σύγκριση λειτουργικών έναντι μη λειτουργικών επιφανειοδραστικών ουσιών, οι εκτιμήσεις του σ_{min} είναι περισσότερο από επαρκείς.

Μια πρόσφατη εξέλιξη από τους Seurynck et al., [19], συμβάλλει στη βελτίωση της τρέχουσας PBS. Ένα σύστημα λήψης εικόνας σε πραγματικό χρόνο έχει ενσωματωθεί στην παραδοσιακή συσκευή PBS, το οποίο επιτρέπει τον προσδιορισμό του σ και του εμβαδού της επιφάνειας σε οποιοδήποτε σημείο πάλλεται. Επιπλέον, αντί να παίρνουν απλώς ένα σφαιρικό σχήμα, προσαρμόζουν το προφίλ της φυσαλίδας σε μια έλλειψη. Αυτό αποδίδει αυξημένη ακρίβεια σε σύγκριση με τη σφαιρική προσαρμογή. Αν και εξακολουθεί να μην μπορεί να αποτρέψει τη διαρροή της μεμβράνης, η απεικόνιση σε πραγματικό χρόνο διευκολύνει την οπτική ανίχνευση διαρροής μεμβράνης στο τριχοειδές. Αυτές οι εικόνες με διαρροή μπορούν να απορριφθούν κατά την επεξεργασία δεδομένων, [10].

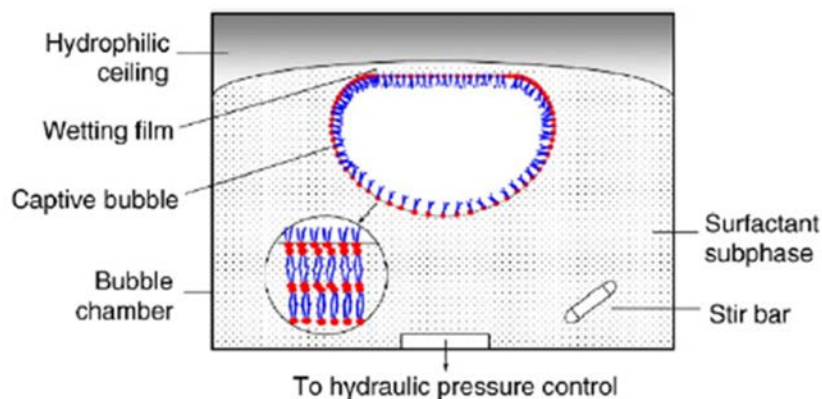
4.3.3 Captive Bubble Surfactometer

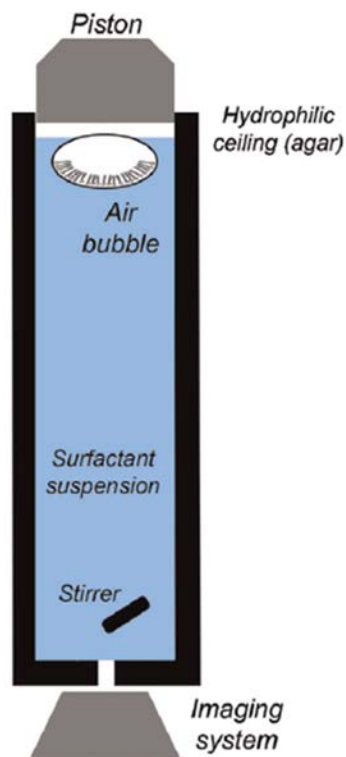
Η μέθοδος Captive Bubble Surfactometer (CBS) εισήχθη για πρώτη φορά από τους Schurch et al. το 1989, [20]. Αν και η μέθοδος μοιάζει αρκετά με την PBS και είναι

επηρεασμένη από αυτήν, προτάθηκε προκειμένου να ξεπεραστούν τα μειονεκτήματα της διαρροής κατά την υψηλή συμπίεση, [3].

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4-5, μια φυσαλίδα αέρα λίγων mm, περίπου 2–7 mm, [10], εισάγεται σε ένα θάλαμο όπου επιπλέει πάνω σε μια οροφή επικαλυμμένη με τζελ άγαρ (agar gel) 1%. Η επίστρωση gel καθιστά την οροφή εντελώς υδρόφιλη (hydrophilic ceiling) όπως φαίνεται στο Σχήμα 4-6. Κατά συνέπεια, η φυσαλίδα, που επιπλέει μέσα στο υγρό, διαχωρίζεται από την οροφή με μια λεπτή βρεγμένη μεμβράνη από το περιβάλλον του υδατικού υγρού, αποφεύγοντας έτσι την προσκόλληση σε οποιοδήποτε στερεό στήριγμα και προφανώς εξαλείφοντας όλες τις πιθανές οδούς για τη διαρροή μεμβράνης. Η επιφάνεια της φυσαλίδας και επομένως και η επιφανειακή τάση μεταβάλλονται αλλάζοντας την πίεση του θαλάμου με το υγρό με ένα πιστόνι. Συνεπώς, το μέγεθός της μεταβάλλεται περιοδικά προσομοιώνοντας την αναπνοή, με συχνότητα μέχρι και 60 κύκλοι/min.

Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι η χρήση της επίστρωσης άγαρ δεν είναι πάντα απαραίτητη υπό την προϋπόθεση ότι η οροφή είναι λεία και υδρόφιλη. Έχει αποδειχθεί ότι ένας θάλαμος κατασκευασμένος από ανοξείδωτο χάλυβα χωρίς επίστρωση άγαρ είναι επίσης ικανός να διατηρεί ένα στεγανό περιβάλλον, [10].





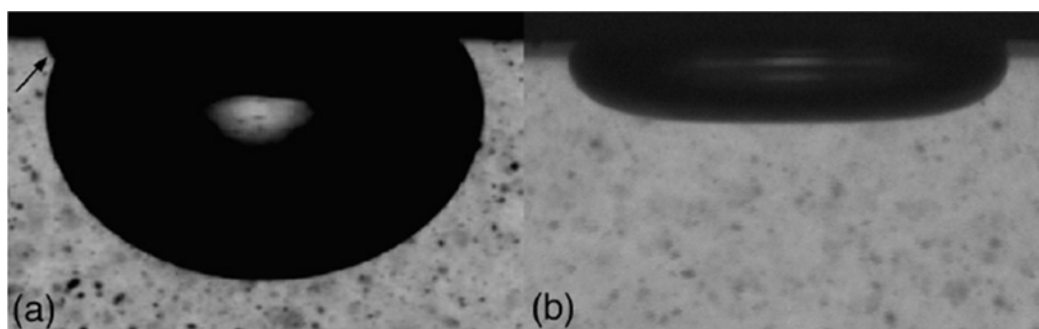
Σχήμα 4-5: Σχηματική αναπαράσταση της Captive Bubble Surfactometer, [10].

Ο αρχικός θάλαμος CBS κατασκευάστηκε από μια αεροστεγή σύριγγα που καθιστά πολύ δύσκολη την εξάπλωση των μεμβρανών, έτσι ώστε να μελετώνται μόνο προσροφημένες μεμβράνες. Με μια τεχνική εξάπλωσης μεμβράνης που αναπτύχθηκε από τους Putz et al., [21], οι μεμβράνες απλώνονται από οργανικά επιφανειοδραστικά στην επιφάνεια της φυσαλίδας με μια μικροσύριγγα, ακολουθούμενη από εξαντλητική αντικατάσταση υποφάσης για την απομάκρυνση του ατμού του οργανικού διαλύτη. Συγκεκριμένα, η φυσαλίδα αέρα δημιουργείται σε ένα αεροστεγές θάλαμο με νερό χωρίς καμία επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα, αποτρέποντας με αυτό τον τρόπο την διαρροή υλικού.

Ένας άλλος τύπος τεχνικής διασποράς αναπτύχθηκε από τους Schurch et al., [22], είναι αυτός στον οποίο οι μεμβράνες απλώνονται/προσροφούνται στην επιφάνεια της φυσαλίδας από ένα υδατικό εναιώρημα επιφανειοδραστικού υψηλής συγκέντρωσης χρησιμοποιώντας μια μικροσύριγγα. Για να εξασφαλιστεί ότι η επιφανειοδραστική ουσία επιπλέει γύρω από την επιφάνεια της φυσαλίδας για να ενισχύσει την εξάπλωση, η υποφάση φυσιολογικού ορού μπορεί να περιέχει 10 wt.% σακχαρόζη, η οποία αυξάνει την πυκνότητα της υποφάσης, [10].

Μετά το σχηματισμό της μεμβράνης, η φυσαλίδα μπορεί να συμπιεστεί και να διασταλεί είτε με σχεδόν στατικό είτε με δυναμικό τρόπο μεταβάλλοντας την υδραυλική πίεση στο θάλαμο. Η πίεση μπορεί να αλλάξει μεταβάλλοντας τον όγκο του θαλάμου ή ρυθμίζοντας τη ροή υγρού μεταξύ του θαλάμου και μιας εξωτερικής δεξαμενής (με τον κατασκευασμένο πλαστικό θάλαμο). Η συχνότητα μπορεί να ποικίλλει από εξαιρετικά αργή (δηλ. στην περίπτωση στατικής ανακύκλωσης) έως και ταχύτερα από 60 κύκλους/λεπτό, [61].

Σε αντίθεση με την PBS, το σχήμα της φυσαλίδας στη CBS δεν μπορεί να θεωρηθεί σφαιρικό λόγω του σχετικά μεγάλου μεγέθους του όπως φαίνεται στην πράξη από το Σχήμα 4-6(a) και Σχήμα 4-6(b) για δύο τυπικές εικόνες Captive Bubble (CB) με διαφορετική επιφανειακή τάση.



Σχήμα 4-6: Τυπικές εικόνες CB (a) στα 21 mN/m και (b) στα 1.3 mN/m, [10].

Επομένως, το σχήμα της φυσαλίδας προσδιορίζεται από τη μηχανική ισορροπία μεταξύ των δυνάμεων επιφανειακής τάσης και της τοπικής βαρύτητας, τροποποιώντας τον νόμο Young-Laplace, [10]:

$$\gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) = \frac{2\gamma}{R_0} + \Delta \rho g z \quad \text{Εξίσωση 2}$$

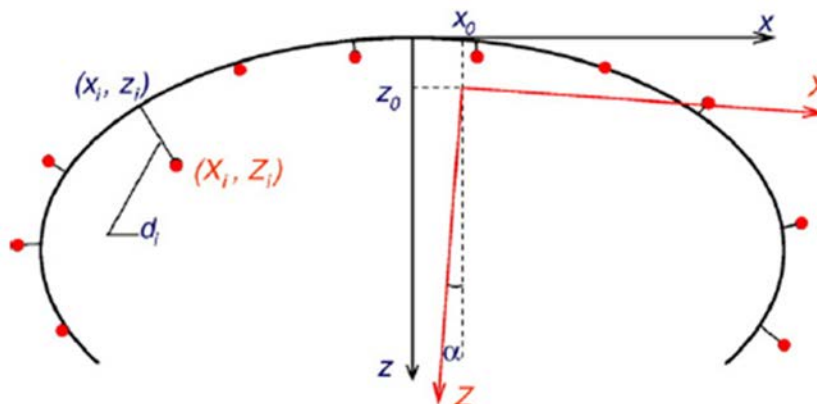
όπου R_1 και R_2 είναι οι δύο κύριες ακτίνες καμπυλότητας στο υπό μελέτη σημείο της επιφάνειας, οι οποίες αντανakλούν το σχήμα της φυσαλίδας, R_0 είναι η ακτίνα καμπυλότητας στην κορυφή της φυσαλίδας, $\Delta \rho$ είναι η διαφορά πυκνότητας κατά μήκος της διεπαφής, g είναι η τοπική βαρυτική επιτάχυνση, z είναι η κατακόρυφη απόσταση από την κορυφή έως το σημείο που μελετήθηκε. Η αδιαστατοποίηση της εξίσωσης 2 αποδίδει μια χαρακτηριστική αδιάστατη παράμετρο, που ονομάζεται αριθμός Bond (Bo), [10]:

$$Bo = \frac{\Delta \rho g R_0^2}{\gamma} \quad \text{Εξίσωση 3}$$

Ο αριθμός Bond αντανακλά τις σχετικές επιδράσεις της βαρύτητας ως προς τις τριχοειδείς δυνάμεις που επιδρούν στο σχήμα μιας σταγόνας/φουσαλίδας. Ως εκ τούτου, είναι δυνατό να προσδιοριστεί το σ από το σχήμα της φουσαλίδας αφού είναι γνωστή η βαρύτητα. Ένας τρόπος χαρακτηρισμού του σ από το σχήμα της φουσαλίδας είναι η χρήση της αναλογίας ύψους προς διάμετρο της φουσαλίδας, όπως διατυπώθηκε από τους Malcolm και Elliott, [23]. Το εμβαδόν και ο όγκος των φουσαλίδων μπορούν να υπολογιστούν από πολυωνυμικές συναρτήσεις που προκύπτουν από μετρήσεις μιας σειράς φουσαλίδων δείγματος με ένα ευρύ φάσμα αναλογιών ύψους προς διάμετρο.

Όσον αφορά τον προσδιορισμό του σ , του εμβαδού επιφάνειας και του όγκου από μια εικόνα με φουσαλίδες, αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση της τεχνικής Axisymmetric Drop Shape Analysis (ADSA). Το ADSA αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τον Neumann, [24], και βελτιώνεται συνεχώς τις τελευταίες δύομισι δεκαετίες. Εννοιολογικά, το ADSA προσδιορίζει το σ προσαρμόζοντας αριθμητικά το σχήμα των πειραματικών σταγόνων ή φουσαλίδων στα θεωρητικά προφίλ που δίνονται από την εξίσωση τριχοειδούς του Laplace (Σχήμα 4-7). Οι παράμετροι εισόδου του ADSA είναι οι g , $\Delta\rho$, και ένα πλήθος συντεταγμένων $X_i - Z_i$ του πειραματικού προφίλ σταγόνας/φουσαλίδας ανιχνεύεται αυτόματα με ψηφιακή ανάλυση εικόνας, όπως φαίνεται στο Σχήμα 4-7. Η ADSA συγκρίνει τις πειραματικές συντεταγμένες ($X_i - Z_i$) με θεωρητικές Λαπλασιανές καμπύλες ($x - z$ σύστημα συντεταγμένων). Αναφορικά, οι εν λόγω καμπύλες προκύπτουν από την αριθμητική ολοκλήρωση της τροποποιημένης εξίσωσης Laplace (εξ. 2). Η επιφανειακή τάση υπολογίζεται μέσω μιας επαναληπτικής διαδικασίας επιλύοντας για κάθε πειραματικό προφίλ ένα πρόβλημα βελτιστοποίησης. Η αναλυτική περιγραφή της ADSA βρίσκεται στην [87].

Το ADSA εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στην ανάλυση εικόνων captive bubble από τους Prokop et al., [25]. Μια νέα γενιά ADSA, που αναπτύχθηκε πρόσφατα, χρησιμοποίησε προηγμένη ανάλυση εικόνας, και αυτό το νέο ADSA είναι ικανό να μετρήσει αυτόματα το σ σε θολά ρευστά, όπως το πνευμονικό επιφανειοδραστικό στο οποίο εισάγεται οπτικός θόρυβος από αδιάλυτα επιφανειοδραστικά συσσωματώματα και μερικές φορές *satellite* φουσαλίδες (π.χ. στο Σχήμα 4-6(α)). Επίσης το νέο ADSA βρέθηκε ότι είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για τη μελέτη επιφανειοδραστικών ουσιών με πολυμερή πρόσθετα, στα οποία η θολότητα του συστήματος αυξάνεται.



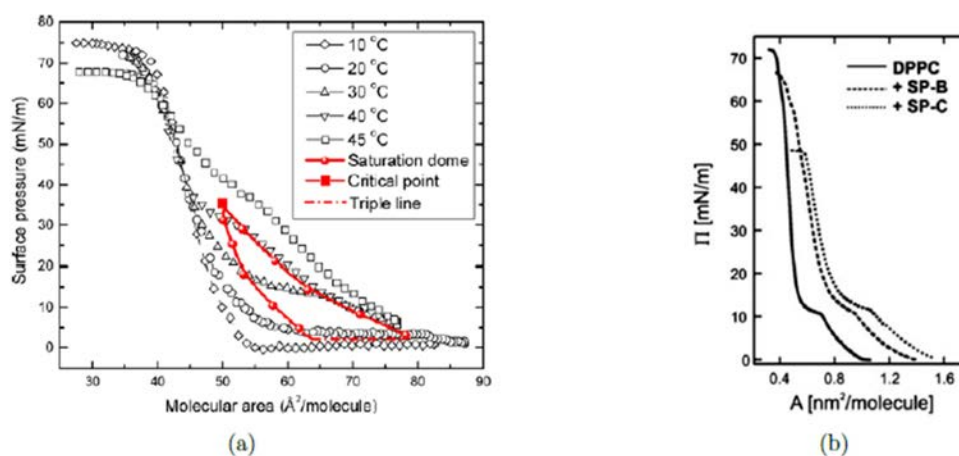
Σχήμα 4-7: Αρχή αξονικής ανάλυσης σχήματος σταγόνας (ADSA), [10].

Υπό μια αυστηρή έννοια, ο προσδιορισμός του σ από το σχήμα μιας σταγόνας/φουσαλίδας μπορεί να εφαρμοστεί μόνο σε μια συνθήκη ισορροπίας αφού η εξίσωση Laplace (Εξίσωση 2) εξετάζει μόνο την ισορροπία μεταξύ της βαρύτητας και των τριχοειδών δυνάμεων. Κάτω από μια εξαιρετικά δυναμική συνθήκη, όπως η δυναμική συχνότητα στη CBS, το προφίλ της φουσαλίδας μπορεί να αποκλίνει από το θεωρητικό προφίλ που προβλέπεται από την εξίσωση Laplace λόγω υδροδυναμικών φαινομένων, όπως αδρανειακές, ιξώδεις δυνάμεις που προκαλούνται από τη ροή ρευστού). Αυτό μπορεί να δημιουργήσει σφάλματα στη μέτρηση του σ , όταν χρησιμοποιείται η μέθοδος ADSA. Οι Liao et al. έχουν μελετήσει τα υδροδυναμικά αποτελέσματα στη μέτρηση του δυναμικού σ χρησιμοποιώντας μια ταλαντευόμενη φουσαλίδα, [26]. Τα αποτελέσματα από την αριθμητική προσομοίωση έδειξαν ότι τα υδροδυναμικά φαινόμενα ήταν αμελητέα εκτός από ορισμένες ακραίες συνθήκες, όπως στην περίπτωση ενός πολύ παχύρρευστου υγρού που ταλαντώνεται σε εξαιρετικά υψηλή συχνότητα. Για μια φουσαλίδα σε υδάτινα μέσα, μόνο εάν η συχνότητα ταλάντωσης είναι μικρότερη από 10 Hz (δηλαδή, 600 κύκλους/λεπτό) τα προφίλ φουσαλίδων που προβλέπονται από το ADSA και από το μοντέλο που εξετάζει τα υδροδυναμικά φαινόμενα θα συμφωνούν καλά μεταξύ τους, [62]. Οι επιδράσεις των ιξωδών δυνάμεων (viscous forces) στη μέτρηση ADSA μελετήθηκαν επίσης από τους Freer et al, [27], όπου όμοια διαπιστώθηκε ότι οι δυνάμεις αυτές ήταν μόνο αρκετά σημαντικές ώστε να αλλάξουν τη μέτρηση ADSA για υγρά υψηλά ιξώδη κατά την εξαιρετικά γρήγορη δυναμική ταλάντωση.

Η CBS έχει χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση του ρυθμού προσρόφησης (χρόνος μέχρι την ισορροπία), των τιμών της ελάχιστης και μέγιστης επιφανειακής τάσης σ_{min} και σ_{max} ,

κατά τη διάρκεια του κύκλου στατικής ή δυναμικής συμπίεσης-διαστολής και του ποσοστού μείωσης της επιφάνειας που απαιτείται για την επίτευξη του σ_{min} από το σ_{max} . Το ποσοστό μείωσης της επιφάνειας έχει αποδειχθεί ότι είναι πιο ευαίσθητη παράμετρος από το σ_{min} στην αξιολόγηση της επιφανειακής δραστηριότητας του πνευμονικού επιφανειοδραστικού, ειδικά στη μελέτη της αναστολής του επιφανειοδραστικού. Επιπλέον, λόγω της μη-διαρροής, η CBS είναι κατάλληλη για τη μελέτη μηχανισμών επιφανειοδραστικών μεμβρανών, όπως η δυνατότητα συμπίεσης της μεμβράνης, η σταθερότητα και η κατάρρευση σε πολύ υψηλή π. Για μεμβράνες που έχουν προσροφηθεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις επιφανειοδραστικού (0,2–0,5 mg/mL), είναι εφικτό να επιτευχθεί σχεδόν μηδενικό σ εύκολα με μέτρια αναλογία συμπίεσης (δηλαδή μείωση επιφάνειας < 20%), [10]. Αυτό συμβαδίζει με τις *in situ* μετρήσεις. Οι μελέτες της σταθερότητας της μεμβράνης στη CBS γίνονται συνήθως με δύο διαφορετικούς τρόπους. Η σταθερότητα μπορεί να εξεταστεί συμπιέζοντας τη φυσαλίδα και κρατώντας τον όγκο σε μια ελάχιστη τιμή. Μια σταθερή μεμβράνη είναι σε θέση να διατηρεί το σ_{min} (με ισόχωρο τρόπο) χωρίς να επιστρέφει προς την ισορροπία για παρατεταμένη περίοδο. Ομοίως, η σταθερότητα μπορεί να εξεταστεί μελετώντας το ρυθμό μείωσης της επιφάνειας των φυσαλίδων που απαιτείται για να διατηρηθεί ένα σταθερό σ , δηλαδή με ισοβαρικό τρόπο. Εναλλακτικά, η σταθερότητα μπορεί να εξεταστεί μελετώντας τα "κλικ φυσαλίδων" (*bubble clicks*), δηλαδή μια ξαφνική μείωση στην περιοχή των φυσαλίδων που σχετίζεται με μια αύξηση του σ , η οποία υποδηλώνει μερική κατάρρευση της επικάλυψης μεμβράνης επιφανειοδραστικού στην επιφάνεια της φυσαλίδας. Οι φυσαλίδες που είναι επικαλυμμένες με μια σταθερή μεμβράνη έχουν λιγότερη τάση να "κλικάρουν". Η CBS είναι επίσης ευέλικτη όσον αφορά τη δυνατότητα να ποικίλλει ανεξάρτητα την ποσότητα συμπίεσης της μεμβράνης (δηλαδή την αναλογία συμπίεσης) και την ταχύτητα συμπίεσης (δηλαδή το ρυθμό συμπίεσης). Επιπλέον, σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές, η CBS είναι σε θέση να ελέγχει μια ποικιλία από τις χαρακτηριστικές συμπεριφορές του πνευμονικού επιφανειοδραστικού, όπως το *reservoir* επιφανειοδραστικού που σχετίζεται με την επιφάνεια, χρησιμοποιώντας μια τεχνική εξάντλησης υποφάσης και μια τεχνική στερεοποίησης υποφάσης (στερεοποίηση της επένδυσης υποφάσης-επιφανειοδραστικού σε διάλυμα αλγινικού νατρίου με προσθήκη ιόντων ασβεστίου). Εκτός από τις μετρήσεις σ , η CBS έχει επεκταθεί ευρέως και σε άλλες έρευνες, π.χ., σε ιδιότητες μεταφοράς αερίων των μεμβρανών πνευμονικού επιφανειοδραστικού, στα χαρακτηριστικά διάλυσης αναισθητικών ατμών και αερίων, [10].

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της CBS είναι η ικανότητα διεξαγωγής ερευνών σε φυσιολογικές και υψηλότερες θερμοκρασίες. Για παράδειγμα, με το LWB είναι δύσκολο να αποδειχθεί ότι οι DPPC μπορούν να φτάσουν τιμές Π όπως 70 mN/m (δηλαδή κοντά σε μηδενική σ) στους 37°C και σχετικά λίγες μελέτες που χρησιμοποιούν αυτή τη συσκευή δείχνουν τιμές Π υψηλότερες από 50 mN/m ακόμη και σε θερμοκρασία δωματίου, όταν οι μεμβράνες συμπιέζονται με σχεδόν στατικό τρόπο, [63], [64]. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4-8.



Σχήμα 4-8: α) Ισόθερμες συμπίεσης του DPPC σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών. β) Ισόθερμες συμπίεσης του DPPC που δείχνουν την επίδραση της προσθήκης SP-B/SP-C, [10].

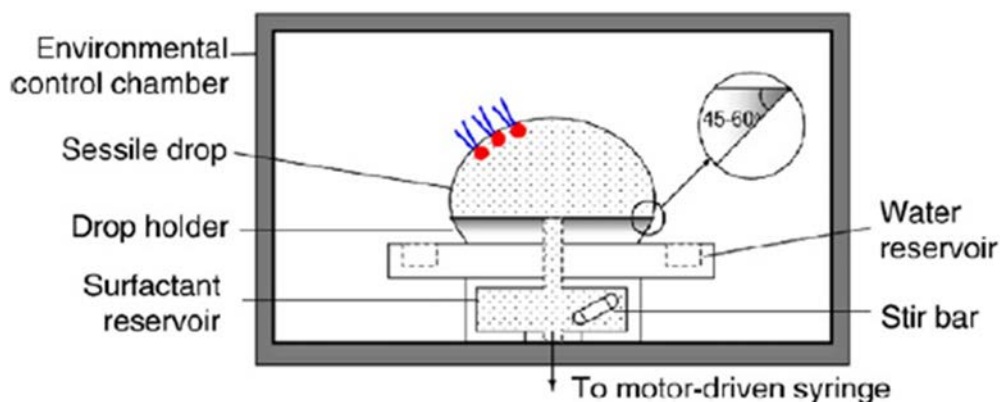
Στην πραγματικότητα, τα αποτελέσματα από μια σειρά μελετών LWB κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι μονοστιβάδες DPPC γίνονται ασταθείς κάπως πάνω από τους 41°C, [28], [65], [66], [67], που φυσικά αντιστοιχεί στην θερμοκρασία T_m (main transition temperature gel to fluid) για τις διπλές στρώσεις DPPC. Αυτές οι πειραματικές μελέτες πρότειναν ότι οι μονοστιβάδες του πνευμονικού επιφανειοδραστικού μπορεί να έχουν ένα κρίσιμο σημείο. Ένα κρίσιμο σημείο μπορεί να οριστεί ως η θερμοκρασία και η πίεση πάνω από την οποία οι ιδιότητες δύο φάσεων δεν παραμένουν πλέον διακριτές. Για παράδειγμα, πάνω από 31°C και 73 ατμόσφαιρες, το CO_2 γίνεται υπερκρίσιμο CO_2 , ένα ρευστό που έχει τα χαρακτηριστικά τόσο υγρού όσο και αερίου. Ωστόσο, πιο πρόσφατες έρευνες με χρήση της CBS έδειξαν ότι οι απλές μονοστιβάδες DPPC λιώνουν μεταξύ 48 και 53°C και δεν βρήκαν στοιχεία για κρίσιμη συμπεριφορά, [68], . Ενώ η περίπτωση της κρίσιμης συμπεριφοράς των μονοστιβάδων του πνευμονικού επιφανειοδραστικού εξαρτάται από πολλά επιχειρήματα, αυτά τα δεδομένα τήξης καθιστούν αυτό το φαινόμενο αμφισβητήσιμο. Σε κάθε περίπτωση, τέτοιες μελέτες CBS τονίζουν το πλεονέκτημα της χρήσης αυτής της συσκευής για πειραματισμό υπό ακραίες συνθήκες.

Ωστόσο, η συσκευή CBS έχει επίσης αδυναμίες. Πρώτον, σε αντίθεση με την LWB, το σ και η επιφάνεια (δηλαδή η περιοχή φυσαλίδων) στο CBS είναι συζευγμένες. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το εμβαδόν μιας φυσαλίδας είναι συνάρτηση όχι μόνο του όγκου της αλλά και του σχήματός της όπως καθορίζεται από τις δυνάμεις σ . Όταν μια φυσαλίδα με επικάλυψη επιφανειοδραστικής ουσίας συμπιέζεται, ο όγκος της φυσαλίδας μειώνεται, γεγονός που τείνει να μειώνει την επιφάνεια των φυσαλίδων, και εν τω μεταξύ, μειώνεται το σ , το οποίο τείνει να αυξήσει την επιφάνεια των φυσαλίδων. Για αυτό το λόγο, είναι πιο δύσκολο να ελεγχθεί με ακρίβεια η επιφάνεια φυσαλίδων από τον όγκο της στη CBS. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις αυτό δε δημιουργεί σοβαρή ανησυχία για τις καταγεγραμμένες ισόθερμες $\sigma - A$, επειδή η φαινομενική επιφάνεια κάθε φορά εξακολουθεί να υπολογίζεται με βάση την ίδια εικόνα φυσαλίδας από την οποία υπολογίζεται το σ . Δεύτερον, σε σύγκριση με την PBS, η λειτουργία και η επεξεργασία δεδομένων της CBS είναι σχετικά χρονοβόρα. Το πρόβλημα της πολύπλοκης επεξεργασίας δεδομένων μπορεί να λυθεί σε μεγάλο βαθμό χρησιμοποιώντας την ADSA. Τρίτον, για τις μελέτες προσρόφησης, η μέγιστη συγκέντρωση συνήθως περιορίζεται σε όχι περισσότερο από 3 mg/mL, [70]. Αυτός ο περιορισμός προκύπτει από οπτικούς περιορισμούς, καθώς τα εναιωρήματα επιφανειοδραστικών ουσιών γίνονται θολά και τελικά αδιαφανή σε αυξημένες συγκεντρώσεις. Τα επιφανειοδραστικά υψηλής συγκέντρωσης μπορούν να μελετηθούν χρησιμοποιώντας τεχνικές διασποράς. Τέλος, η CBS ενδέχεται να μην εξασφαλίζει αυτόματα πλήρη ενυδάτωση. Αυτή η ανησυχία προκύπτει όταν η CBS χρησιμοποιείται για τη μελέτη της προσρόφησης επιφανειοδραστικών ουσιών στην οποία η ταχέως απορροφούμενη επιφανειοδραστική μεμβράνη μπορεί να αποτελεί εμπόδιο στην εξάτμιση του νερού, επιβραδύνοντας έτσι τη διαδικασία ενυδάτωσης. Αν και οι άμεσες μετρήσεις υγρασίας στη φυσαλίδα δεν είναι ακόμη διαθέσιμες, υπήρχε σαφώς διαφορά στην κινητική προσρόφησης και στη σταθερότητα των μεμβρανών επιφανειοδραστικού εκχυλίσματος βοείου λιπιδίου (Bovine Lipid Extract Surfactant – BLES) που σχηματίζονται σε φυσαλίδες αέρα περιβάλλοντος και προ-υγροποιημένου αέρα, [10], [29].

4.3.4 Constrained Sessile Drop

Το πρωτότυπο του Constrained Sessile Drop (CSD) αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τους Wulf et al., [30], για την ταυτόχρονη μέτρηση του σ και της πυκνότητας των τηγμένων πολυμερών. Αργότερα τροποποιήθηκε από τους Yu et al., [31], για τον

προσδιορισμό του σ του πνευμονικού επιφανειοδραστικού. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4-7, μια σταγόνα (4~8 μL) πνευμονικού επιφανειοδραστικού στηρίζεται σε ένα βάθρο, το οποίο χρησιμοποιεί μια αιχμηρή άκρη μαχαιριού για να αποτρέψει την εξάπλωση της σταγόνας, εξαλείφοντας έτσι τη διαρροή μεμβράνης, [10]. Το βάθρο είναι κατεργασμένο από ανοξείδωτο χάλυβα με διάμετρο 2,5 έως 4 mm, [10]. Η γωνία μεταξύ της οριζόντιας και της πλευρικής επιφάνειας του βάθρου είναι 45° έως 60°. Το βάθρο έχει μια κεντρική οπή 0,5 mm, μέσω της οποίας η σταγόνα συνδέεται με ένα reservoir επιφανειοδραστικού 0,5–0,75 mL, [10]. Η δεξαμενή-reservoir επιφανειοδραστικού αναδεύεται συνεχώς από μια μαγνητική ράβδο ανάδευσης. Ο σχηματισμός και η ταλάντωση της επικαθήμενης σταγόνας (sessile drop) πραγματοποιείται από μια προγραμματιζόμενη μηχανική σύριγγα συνδεδεμένη με το reservoir επιφανειοδραστικού.



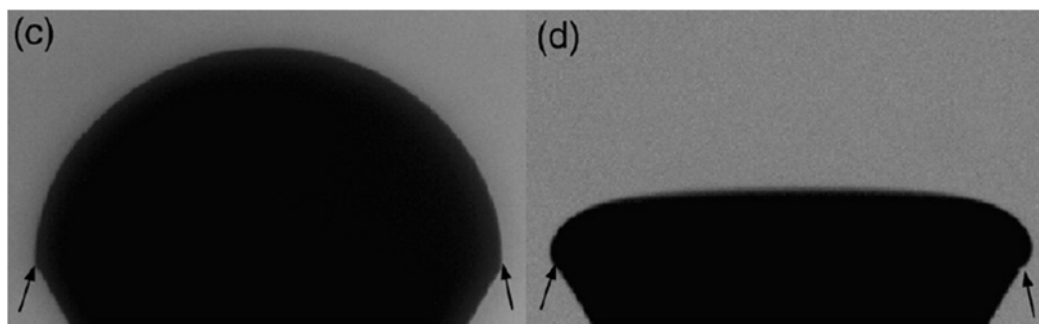
Σχήμα 4-9: Σχηματική αναπαράσταση του Constrained Sessile Drop, [10].

Ο σχηματισμός μεμβράνης στη CSD μπορεί να διεξαχθεί με προσρόφηση ή διασπορά. Για τις μελέτες προσρόφησης, μπορεί να σχηματιστεί μια σταγόνα εντός 0,5 δευτερολέπτου, η οποία διασφαλίζει την προσρόφηση σε μια διεπαφή φρέσκου, καθαρού αέρα-νερού. Η διασπορά στο CSD είτε από υδατικό διάλυμα είτε από οργανικό διαλύτη είναι επίσης απλή. Μετά το σχηματισμό της μεμβράνης, η σταγόνα μπορεί να ταλαντωθεί με προκαθορισμένο λόγο συμπίεσης και ρυθμό συμπίεσης, από πολύ αργό έως πολύ γρήγορο.

Η CSD διευκολύνει τον αυστηρό ατμοσφαιρικό έλεγχο μέσω ενός θαλάμου περιβαλλοντικού ελέγχου. Η πλήρης ενυδάτωση, που παρακολουθείται από ένα υγρόμετρο, εξασφαλίζεται από ένα reservoir νερού που περικλείεται στον θάλαμο. Ένα πολλαπλό σύστημα αερίου (για την παραγωγή διαφορετικών συνθέσεων αερίων) και ένα σύστημα αέριας χρωματογραφίας (για την ανάλυση της σύνθεσης του αερίου) βρίσκονται

υπό ανάπτυξη. Αυτή η εξέλιξη στοχεύει στη μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συνθέσεων αερίων στην επιφανειακή δραστηριότητα των μεμβρανών πνευμονικού επιφανειοδραστικού. Έχει αναφερθεί ότι διαφορετικά αέρια, όπως το CO_2 και τα αέρια φθοράνθρακα επηρέασαν την επιφανειακή δραστηριότητα των μεμβρανών πνευμονικού επιφανειοδραστικού και φωσφολιπιδίων.

Μέχρι στιγμής, δεν έχουν βρεθεί σοβαροί περιορισμοί με τη μέθοδο CSD. Αυτή η συσκευή εξαλείφει τόσο τα προβλήματα διαρροής μεμβράνης, όπως στη LWB και στην PBS, όσο και τον περιορισμό συγκέντρωσης, όπως στην CBS. Σε σύγκριση με την CBS, η CSD είναι πολύ απλούστερη και ευκολότερη στη λειτουργία του και απαιτεί πολύ μικρότερη ποσότητα υγρού δείγματος (δηλαδή, μόνο μερικά μικρολίτρα για κάθε μέτρηση). Το σ , το εμβαδόν της επιφάνειας και ο όγκος της σταγόνας μπορούν να υπολογιστούν αυτόματα από την ADSA με ένα απλοποιημένο σχήμα ανάλυσης εικόνας, εκμεταλλευόμενο των ακραίων τιμών υψηλής αντίθεσης μιας εικόνας επικαθήμενης σταγόνας (Σχήμα (c) και (d)).



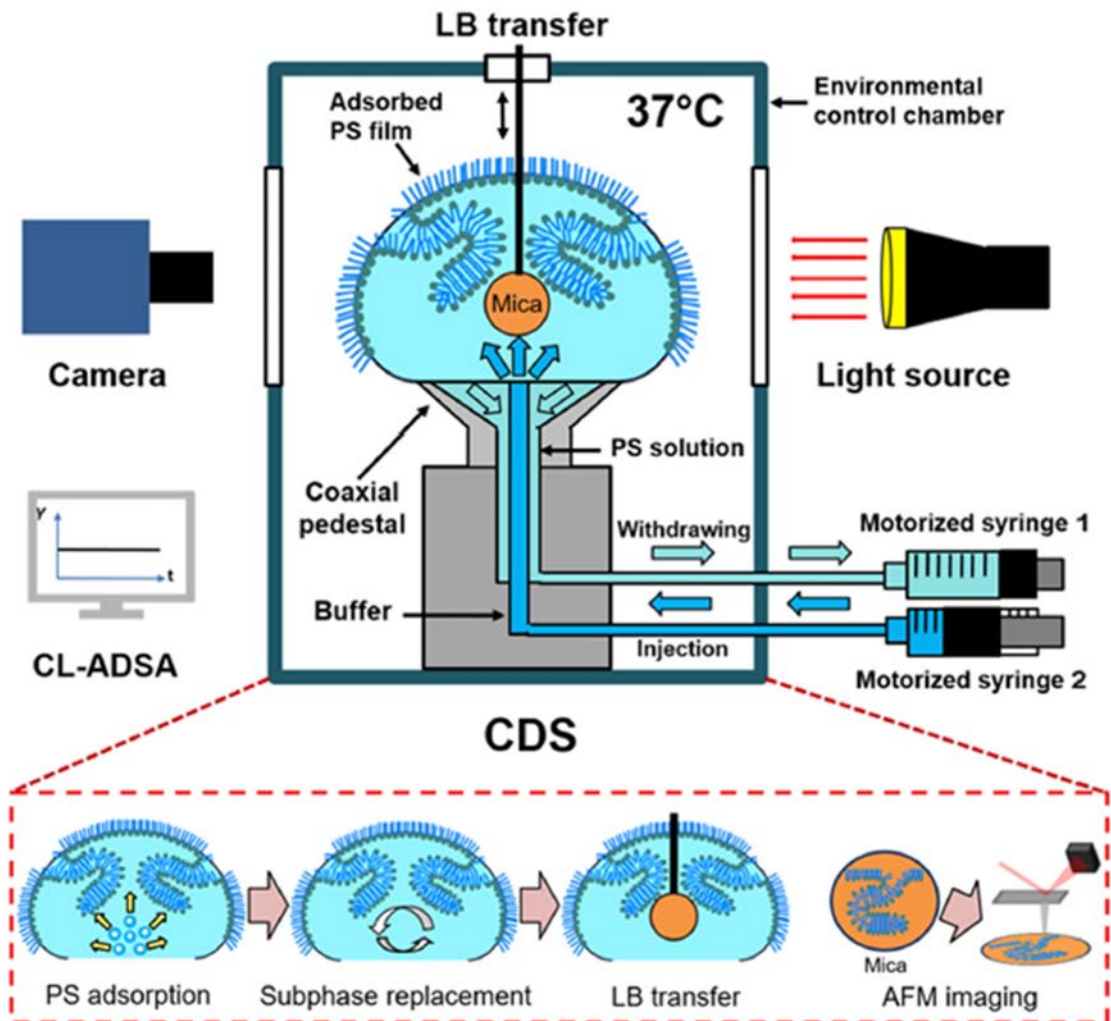
Σχήμα 4-10: Τυπικές εικόνες CSD (a) στα 47 mN/m και (b) στα 0.68 mN/m, [10].

Η CSD είναι κατάλληλη για τη μέτρηση του χαμηλού σ των μεμβρανών πνευμονικού επιφανειοδραστικού που σχηματίζονται από την προσρόφηση από μια υποφάση επιφανειοδραστικής ουσίας σε φυσιολογικά σχετικές συγκεντρώσεις. Οι πρώιμες δοκιμές έδειξαν καλή συμφωνία μεταξύ των μετρήσεων CSD και CBS, [32]. Η CSD έχει εφαρμοστεί σε ποικίλες μελέτες, όπως στην επίδραση της υγρασίας στον σχηματισμό και στην ανακύκλωση της μεμβράνης και στην ανάπτυξη πρόσθετων πολυμερών για κλινικές επιφανειοδραστικές ουσίες, [10], [29].

4.3.5 Constrained Drop Surfactometry

Η μέθοδος Constrained Drop Surfactometry (CDS) προέρχεται από μια νέα γενιά τεχνικής μέτρησης τάσης με σταγονίδια που αναπτύχθηκε πρόσφατα [37]. Όπως φαίνεται

στο Σχήμα 4-11, το CDS χρησιμοποιεί την επιφάνεια αέρα-νερού μιας επικαθήμενης σταγόνας (sessile drop) (~30 mL σε όγκο, ~5 mm σε διάμετρο και ~0,4 cm² στην επιφάνεια) για να φιλοξενήσει τη απορροφημένη μεμβράνη πνευμονικού επιφανειοδραστικού, [37]. Η σταγόνα επιφανειοδραστικής ουσίας περιορίζεται σε ένα επεξεργασμένο κουτί χρησιμοποιώντας τα αιχμηρά άκρα του για να αποτρέψει τη διαρροή μεμβράνης ακόμη και σε χαμηλές επιφανειακές τάσεις. Η προσροφημένη επιφανειοδραστική μεμβράνη μπορεί να συμπίεζεται και να διαστέλλεται περιοδικά με σχετικά φυσιολογικούς ρυθμούς και αναλογίες συμπίεσης ελέγχοντας τη ροή υγρού από και προς το σταγονίδιο χρησιμοποιώντας μια μηχανοκίνητη σύριγγα. Η επιφανειακή τάση και το εμβαδόν της επιφάνειας της μεμβράνης του πνευμονικού επιφανειοδραστικού προσδιορίζονται ταυτόχρονα χρησιμοποιώντας πρόσφατα αναπτυγμένη ανάλυση αξονικής-μετρικής σταγόνας κλειστού βρόχου (CL-ADSA). Λόγω της δυνατότητας σμίκρυνσης του συστήματος, το CDS επιτρέπει την προσομοίωση υψηλής πιστότητας φυσιολογικών συνθηκών, δηλαδή της θερμοκρασίας του σώματος σε 37°C και σχετική υγρασία κοντά στο 100%, χρησιμοποιώντας έναν περιβαλλοντικό θάλαμο ελέγχου.



Σχήμα 4-11: Σχηματική αναπαράσταση του Constrained Drop Surfactometry, CDS, [37].

Συγκεκριμένα, ένα σταγονίδιο Infasurf ή Curosurf 30-mL ή 1 mg/mL αποτέθηκε σε ένα κουτί CDS 5mm μέσω μιας πιπέτας. Αμέσως μετά το σχηματισμό του σταγονιδίου, καταγράφηκε η επιφανειακή τάση ανά τακτά χρονικά διαστήματα και βρέθηκε ότι μειώνεται γρήγορα (μέσα σε δευτερόλεπτα) σε μια τιμή ισορροπίας περίπου 22-25mN/m, υποδεικνύοντας τον γρήγορο σχηματισμό της προσροφημένης μεμβράνης πνευμονικού επιφανειοδραστικού στην επιφάνεια αέρα-νερού του σταγονιδίου, [10], [37]. Για να προσομοιώσει καλύτερα την αναπνοή, η απορροφημένη μεμβράνη πνευμονικού επιφανειοδραστικού συμπιέστηκε και επεκτάθηκε με συχνότητα 20 κύκλους ανά λεπτό, που αντιστοιχεί σε ρυθμό συμπίεσης 13,3% της επιφάνειας ανά δευτερόλεπτο.

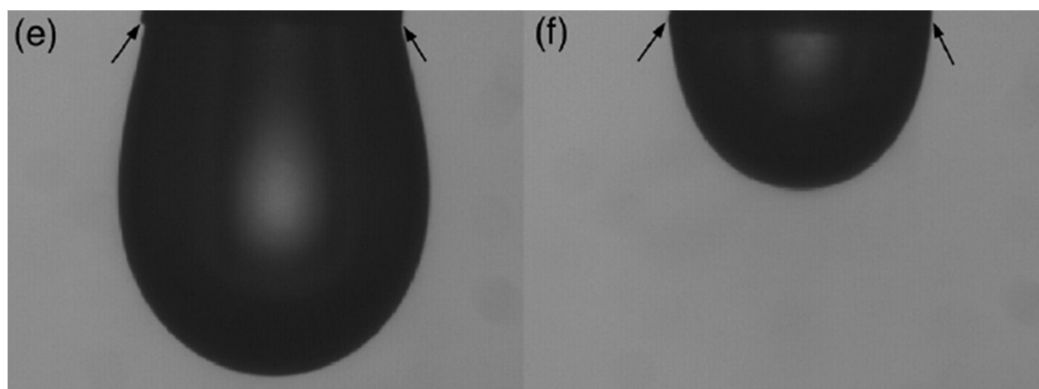
4.3.5.1 Αντικατάσταση υποφάσης και μεταφορά Langmuir-Blodgett (LB)

Για τη μεταφορά της απορροφημένης μεμβράνης πνευμονικού επιφανειοδραστικού για απεικόνιση με AFM, όπως φαίνεται στο Σχήμα 4-11, εφαρμόστηκε η αντικατάσταση υποφάσης χρησιμοποιώντας ένα ομοαξονικό κουτί CDS συνδεδεμένο με δύο μηχανοκίνητες σύριγγες, με τη μία να αποσύρει την υποφάση που περιέχει κυστίδια φωσφολιπιδίου από το σταγονίδιο σε ρυθμό 1 mL/s και την άλλη να εγχέει ταυτόχρονα ρυθμιστικό διάλυμα στο σταγονίδιο με τον ίδιο ρυθμό. Συνεπώς, τα κυστίδια φωσφολιπιδίου στην υδατική υποφάση (δηλ. το σταγονίδιο) ξεπλύθηκαν χωρίς να διαταραχθεί η απορροφημένη μεμβράνη πνευμονικού επιφανειοδραστικού στην επιφάνεια αέρα-νερού, [37]. Μετά την αντικατάσταση της υποφάσης, πραγματοποιήθηκε μεταφορά LB της απορροφημένης μεμβράνης πνευμονικού επιφανειοδραστικού εισάγοντας πρώτα ένα πρόσφατα αποφλοιωμένο φύλλο μαρμαρυγίας μέσα στο σταγονίδιο, και στη συνέχεια ανυψώνοντάς το αργά κατά μήκος της διεπαφής αέρα-νερού του σταγονιδίου με ρυθμό 1 mm/min. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μεταφοράς LB, η μεμβράνη πνευμονικού επιφανειοδραστικού διατηρήθηκε σε σταθερή επιφανειακή πίεση ($\pm 1,5$ mN/m) για παρατεταμένη περίοδο χρησιμοποιώντας CL-ADSA, [71], [72]. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 37°C τουλάχιστον τρεις φορές. Ο ρυθμός εναπόθεσης της μεταφοράς LB, που ορίζεται ως η αναλογία μεταξύ της χαμένης περιοχής της μεμβράνης επιφανειοδραστικής ουσίας κατά τη μεταφορά LB και της συνολικής επιφάνειας του φύλλου μαρμαρυγίας, [73], εκτιμήθηκε ότι είναι $1,24 \pm 0,18$, ο οποίος υποδηλώνει πλήρη μεταφορά του επιφανειοδραστικού φιλμ από την επιφάνεια αέρα-νερού στην επιφάνεια μαρμαρυγίας, [37].

4.3.6 Άλλες μέθοδοι in vitro

Εκτός από τις τέσσερις παραπάνω τεχνικές, άλλες in vitro μέθοδοι είναι διαθέσιμες για την αξιολόγηση της επιφανειακής δραστηριότητας των επιφανειοδραστικών ουσιών. Για παράδειγμα, η επιφανειακή δραστηριότητα μπορεί να εξεταστεί μελετώντας τη σταθερότητα των μικροφουσαλίδων. Οι Enhorning και Holm ανέπτυξαν ένα τριχοειδές επιφανειομετρικό, το οποίο είναι κατάλληλο για την εξέταση του ρόλου της επιφανειοδραστικής ουσίας στη διατήρηση της βατότητας των αεραγωγών, [33]. Αυτή η μέθοδος έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη για την έρευνα που αφορά το άσθμα. Οι Meier et al., [34], ανέπτυξαν ένα ταλαντευόμενο επιφανειομετρικό σταγόνας στο οποίο μια

κρεμάμενη σταγόνα 1 μL ταλαντώνεται σε συντονισμό με έναν διεγέρτη. Αυτή η μέθοδος μετρά ταυτόχρονα το σ και τη διασπορά ενέργειας στην επιφάνεια, παρέχοντας έτσι μια προσέγγιση για την αξιολόγηση του ιξώδους της επιφάνειας. Το σ υπολογίζεται από την πειραματικά προσδιορισμένη περίοδο ταλάντωσης λαμβάνοντας υπόψη την αστάθεια Rayleigh. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος περιορίζεται από το $\sigma_{min} \sim 15 \text{ mN/m}$, όπου η σταγόνα απελευθερώνεται. Οι Bertocchi et al., [35], ανέπτυξαν μια τεχνική ανεστραμμένης διεπαφής στην οποία το σ υπολογίζεται από την καμπυλότητα μιας κρεμάμενης σταγόνας σε μικρό μέγεθος. Σε συνδυασμό με τη μικροσκοπία φθορισμού, αυτή η μέθοδος επιτρέπει τη μελέτη της προσρόφησης αδρανών μεμονωμένων επιφανειοδραστικών, ωστόσο, αυτή η μέθοδος δεν επιτρέπει τη συμπίεση και τη διαστολή των επιφανειοδραστικών μεμβρανών.



Σχήμα 4-12: Τυπικές εικόνες PD (a) στα 42 mN/m και (b) στα 16 mN/m, [10].

Οι Neumann et al., [36], έχουν αναπτύξει ένα σύστημα τανυσομετρίας κρεμάμενης σταγόνας (Pendant Drop – PD), το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με το ADSA για τη μέτρηση της επιφανειακής δραστηριότητας του πνευμονικού επιφανειοδραστικού. Η μέθοδος PD διαθέτει πλεονεκτήματα απλότητας και υψηλής ακρίβειας. Ωστόσο, υποφέρει από το φαινόμενο διαρροής μεμβράνης όταν το σ των επιφανειοδραστικών μεμβρανών μειώνεται στα $\sim 18 \text{ mN/m}$ (Σχήμα 4-12(ε) και (στ) για σε διαφορετικά σ), [25]. Η διαρροή μεμβράνης φαίνεται στην Σχήμα 4-12(στ). Η PD είναι κατάλληλη για τη μελέτη της προσρόφησης επιφανειοδραστικών, καθώς ο περιορισμός της διαρροής μεμβράνης είναι σχετικά μικρότερης σημασίας σε μια τέτοια περίπτωση.

Το επιφανειακό ιξώδες είναι μια από τις κρίσιμες ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τα επιφανειοδραστικά των πνευμόνων, μαζί με τις δυνατότητες μείωσης της επιφανειακής τάσης και συμπίεσης/διαστολής, αλλά δεν έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης τόσο συχνά στο παρελθόν όσο άλλες μηχανικές ιδιότητες, πιθανώς λόγω της πολύπλοκης μαθηματικής

ανάλυσης που απαιτείται. Εκτός από τις διαμορφώσεις PD, άλλα πειράματα σχετικά με τη διασταλτική ρεολογία των τασιενεργών μεμβρανών έχουν πραγματοποιηθεί στην επιφάνεια μιας captive bubble [74], και σε υποδοχές Langmuir, [75], [76], πάντα μέσω της ανάλυσης της απόκρισης της μεμβράνης σε περιοδικές τοπικές ταλαντώσεις. Από την άλλη πλευρά, η πλευρική διάχυση του επιφανειοδραστικού εντός των κυψελών και των αεραγωγών ως συνέπεια των κλίσεων επιφανειακής τάσης καθορίζεται πλήρως από το επιφανειακό ιξώδες διάτμησης των τασιενεργών μεμβρανών, το οποίο σχετίζεται στενά με τη συνύπαρξη στερεών και υγρών φάσεων σε αυτές τις μεμβράνες. Για να καθοριστεί αυτό το χαρακτηριστικό έχουν εφαρμοστεί διαφορετικές τεχνικές, που συνήθως περιλαμβάνουν την εισαγωγή ογκωδών στοιχείων όπως μαγνήτες ή μεταλλικά σφαιρίδια προκειμένου να αξιολογηθούν οι δυνάμεις που απαιτούνται για τη μετατόπισή τους μέσω των 2-διάστατων μεμβρανών, χρησιμοποιώντας ιξωδόμετρα μαγνητικής βελόνας ή κινηματικά μικροϊξώμετρα, [76], [77], [78], [79], [80].

Άλλες εναλλακτικές προσεγγίσεις για τη μελέτη των επιφανειοδραστικών πνευμόνων βασίζονται στην ικανότητα του πνευμονικού επιφανειοδραστικού να σχηματίζει και να σταθεροποιεί φυσαλίδες αφρού, όπως στη μέθοδο Newton black film που επιτρέπει την άμεση παρατήρηση του σχηματισμού αφρώδους μεμβράνης και τον προσδιορισμό της δομής και της σταθερότητάς του, [81], [82], [83], [84]. Αυτή η τεχνική παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία, καθώς η πιθανότητα σχηματισμού μαύρης μεμβράνης εξαρτάται από τη συγκέντρωση φωσφολιπιδίων και πιθανώς από την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες επιφανειοδραστικών πνευμόνων. Η αποτυχία επίτευξης σταθερών μαύρων μεμβρανών έχει συσχετιστεί με την υψηλή πιθανότητα εμφάνισης συνδρόμου αναπνευστικής δυσχέρειας, [85]. Παράγει επίσης άμεσες μετρήσεις του πάχους της αφρώδους μεμβράνης και της πίεσης διάσπασης στις μεμβράνες, επιτρέποντας τον χαρακτηρισμό τους ως προς τις επιφανειακές ηλεκτρικές παραμέτρους, γεγονός που την καθιστά μια σημαντική τεχνική για τη μελέτη της επίδρασης διαφορετικών επιφανειοδραστικών παραγόντων ή πρόσθετων στα επιφανειοδραστικά των πνευμόνων, [86].

4.4 Σύνοψη

Συνοψίζοντας, έχουν αναπτυχθεί διαφορετικές μέθοδοι in vivo, in situ και in vitro για την αξιολόγηση των βιοφυσικών ιδιοτήτων του πνευμονικού επιφανειοδραστικού. Οι μέθοδοι in vitro υπερτερούν των άλλων όσον αφορά την ευκολία λειτουργίας και την

αποτελεσματικότητα στη συλλογή δεδομένων. Μεταξύ των διαθέσιμων μεθόδων in vitro, τέσσερις τεχνικές τασιομετρίας, LWB, PBS, CBS και CSD έχουν δείξει πλήρη ικανότητα προσομοίωσης και μέτρησης και των τριών σημαντικών βιοφυσικών ιδιοτήτων του πνευμονικού επιφανειοδραστικού, δηλ., ταχεία προσρόφηση, χαμηλό σ_{mim} κατά τη συμπίεση της μεμβράνης και περιορισμένο σ_{max} στην επέκταση μεμβράνης. Η επιλογή μιας συγκεκριμένης μεθόδου εξαρτάται από τις μετρήσεις ενδιαφέροντος και την επιθυμητή ακρίβεια.

Κεφάλαιο 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Μετά από περισσότερο από μισό αιώνα έρευνας, το πνευμονικό επιφανειοδραστικό αποδεικνύεται ότι παραμένει ένα "εξαιρετικό μείγμα", [89], γεμάτο εκπλήξεις. Το πιο σημαντικό κίνητρο για τη μελέτη του πνευμονικού επιφανειοδραστικού είναι ίσως οι κλινικές εφαρμογές του. Αν και υπάρχει ακόμη περιθώριο βελτίωσης, όπως η συνεχιζόμενη ανάπτυξη πλήρως συντιθέμενων επιφανειοδραστικών σχεδιαζόμενων ουσιών, η θεραπεία με επιφανειοδραστικό ήταν πολύ επιτυχημένη στη θεραπεία των πρόωρων βρεφών με σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας (Respiratory Distress Syndrome). Ωστόσο, η δυνατότητα εφαρμογής του στο σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (Acute Respiratory Distress Syndrome – ARDS) και σε άλλες πνευμονικές ασθένειες όπως το άσθμα, δεν έχει σαφώς τεκμηριωθεί. Η απενεργοποίηση του πνευμονικού επιφανειοδραστικού αναμφίβολα συμβάλλει στη μη ικανοποιητική απόδοσή του στο ARDS. Οι *in vitro* βιοφυσικές μελέτες οδήγησαν σε δύο διακριτούς μηχανισμούς αναστολής: αναστολή λόγω ανταγωνιστικής προσρόφησης πρωτεϊνών πλάσματος και αναστολή λόγω ανάμειξης και ρευστοποίησης μιας κατά τα άλλα σταθερής μεμβράνης πνευμονικού επιφανειοδραστικού από τα λιπίδια. Αυτή η απλή κατηγοριοποίηση υπονοεί ότι ο πρώτος μηχανισμός επηρεάζει κυρίως την προσρόφηση επιφανειοδραστικού ενώ ο δεύτερος εμποδίζει τις μεμβράνες να φτάσουν σε χαμηλό σ. Πρόσφατες μελέτες που χρησιμοποιούν άμεση απεικόνιση με μεμβράνη, ωστόσο, έδωσαν νέα στοιχεία ότι οι πραγματικοί μηχανισμοί αναστολής που οφείλονται τόσο σε πρωτεΐνες όσο και σε λιπίδια, όπως η χοληστερόλη, θα μπορούσαν να είναι πολύ πιο περίπλοκοι. Επιπλέον, η ακριβής σχέση αυτών των μηχανισμών αναστολής με το ARDS είναι ακόμα απροσδιόριστη. Στο ARDS, τα ενδογενή και εξωγενή επιφανειοδραστικά είναι πιθανό να αδρανοποιηθούν με πολλαπλούς μηχανισμούς. Οι κυρίαρχοι μηχανισμοί με τους οποίους η επιφανειοδραστική ουσία αναστέλλεται *in vivo* δεν έχουν ακόμη καθιερωθεί.

Η υπέρβαση της αναστολής επιφανειοδραστικών διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην επίλυση των κλινικών περιορισμών στη θεραπεία επιφανειοδραστικών στο ARDS. Η χρήση

πολυμερών ως πρόσθετων επιφανειοδραστικών είναι μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση λόγω της ισχυρής προκλινικής της απόδοσης στην αντίσταση στην αναστολή και της απλότητας στη σύνθεση, δηλ. με απλή ανάμειξη υδατοδιαλυτών πολυμερών με επί του παρόντος διαθέσιμα παρασκευάσματα επιφανειοδραστικών. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η επιλογή ενός πολυμερούς πρόσθετου και ο προσδιορισμός της βέλτιστης συγκέντρωσής του απαιτεί την εξέταση φυσιολογικών παραγόντων και όχι μόνο της επιφανειακής δραστηριότητας. Η επιλογή ενός κατάλληλου μοντέλου αξιολόγησης που αντιπροσωπεύει την κλινική πρακτική, η εξέταση της ισορροπίας του πνευμονικού υγρού και των ιδιοτήτων διεπιφανειακής μεταφοράς αερίων, καθώς και η ευκολία της ενστάλαξης στην τραχεία, πρέπει να ληφθούν υπόψη για τις προκλινικές δοκιμές. Ορισμένοι από αυτούς τους περιορισμούς μπορούν να ελαχιστοποιηθούν χρησιμοποιώντας ιοντικά πολυμερή, τα οποία φαίνεται να είναι αποτελεσματικά σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις από τα μη ιονικά πολυμερή. Ωστόσο, η εισαγωγή ιοντικών πολυμερών μπορεί να διαταράξει την ηλεκτροστατική ισορροπία στο σύστημα πνευμονικού επιφανειοδραστικού, γεγονός που πρέπει να εξεταστεί προσεκτικά.

Από τότε που ο Clements διεξήγαγε τις πρώτες άμεσες μετρήσεις σ του πνευμονικού επιφανειοδραστικού χρησιμοποιώντας το δικό του LWB πριν από μισό αιώνα, έχουν αναπτυχθεί πολλές περισσότερες in vitro επιφανειοδραστικές τεχνικές. Συνοψίζονται τα πλεονεκτήματα – μειονεκτήματα και εφαρμογές αυτών των μεθόδων στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 2: Σύγκριση in vitro μεθόδων, [10].

Μέθοδοι	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Κύριες Εφαρμογές
LWB	• Με ακρίβεια ελεγχόμενες μοριακές περιοχές για μείγματα φωσφολιπιδίων. • Εύκολη συναρμολόγηση με διαφορετικές τεχνικές ανάλυσης επιφάνειας. • Διατίθεται στο εμπόριο (π.χ. Kibron Inc., Espoo, Φινλανδία; KSV	• Δύσκολη προσαρμογή για τη μελέτη προσροφημένων μεμβρανών. • Δυσκολία στον έλεγχο του περιβάλλοντος. • Μη ικανή για άμεση	• Μελέτη επιφανειακών ρεολογικών ιδιοτήτων μονοστιβάδων επιφανειοδραστικών. • Μελέτη συμπεριφορών φωσφολιπιδικής φάσης σε συνδυασμό με μικροσκοπικές και

	Instruments Inc., Ελσίνκι Φινλανδία; Nima Technology Ltd, Coventry, UK).	προσομοίωση της αναπνοής. • Το σ που μετράται από μια πλάκα Wilhelmy μπορεί να μην είναι πολύ ακριβές. • Διαρροή μεμβράνης σε χαμηλό σ.	φασματομετρικές μεθόδους.
PBS	• Εξαιρετικά αποδοτικό στο χρόνο ανάλυσης και στην κατανάλωση δειγμάτων. • Άμεση προσομοίωση αναπνοής. • Διατίθεται στο εμπόριο (General Transco, Inc., Largo, FL).	• Το εμπορικό προϊόν δεν διαθέτει ευελιξία στην εκτίμηση της επιφανειακής δραστηριότητας. • Διαρροή μεμβράνης σε χαμηλό σ. • Τα σ που μετρώνται σε χαμηλές τιμές είναι ανακριβή.	• Ποιοτικός έλεγχος κλινικών δειγμάτων. • Ταχεία σύγκριση της επιφανειακής δραστηριότητας πολλών διαφορετικών δειγμάτων.
CBS	• Στενή προσομοίωση κυψελιδικού περιβάλλοντος. • Όχι διαρροές. • Ικανότητα μελέτης τόσο προσροφημένων όσο και διεσπαρμένων μεμβρανών. • Ακριβής και αυτόματη μέτρηση σ σε συνδυασμό με ADSA. • Διατίθεται στο εμπόριο	• Δύσκολη λειτουργία και καθαρισμός. • Το σ και το εμβαδόν της επιφάνειας συσχετίζονται. • Περιορισμός στη μέγιστη συγκέντρωση επιφανειοδραστικού κατά τη μελέτη προσροφημένων μεμβρανών.	• Μελέτη μηχανισμών επιφανειοδραστικών ουσιών. • Ολοκληρωμένη και ακριβής αξιολόγηση των ιδιοτήτων των επιφανειοδραστικών. • Μικροσκοπική ισορροπία Langmuir για τη μελέτη απλών μονοστοιβάδων. • Μελέτη ιδιοτήτων

	(Τμήμα Φυσιολογίας και Βιοφυσικής, Πανεπιστήμιο Calgary).	Μη ελεγχόμενη υγρασία κατά τη μελέτη προσροφημένων μεμβρανών.	μεταφοράς αερίων επιφανειοδραστικών μεμβρανών.
CSD	- Με ακρίβεια ελεγχόμενο πειραματικό περιβάλλον. - Μικρή κατανάλωση δειγμάτων (σε εύρος μL). - Όχι διαρροές. - Ικανότητα μελέτης τόσο προσροφημένων όσο και διεσπαρμένων μεμβρανών. - Ακριβής και αυτόματη μέτρηση σ σε συνδυασμό με ADSA. - Εύκολος χειρισμός και καθαρισμός. - Κανένας περιορισμός ως προς τη συγκέντρωση επιφανειοδραστικού.	Το σ και το εμβαδόν της επιφάνειας συσχετίζονται.	- Μελέτη υψηλών συγκεντρώσεων επιφανειοδραστικού σε πολύ χαμηλά σ. - Μελέτη περιβαλλοντικών επιπτώσεων (υγρασία, σύσταση αερίου κ.λπ.) στην επιφανειοδραστική ουσία. - Μικροσκοπική ισορροπία Langmuir για τη μελέτη απλών μονοστοιβάδων.

Όπως φαίνεται, αυτές οι μέθοδοι έχουν τα δικά τους σχετικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Η επιλογή μιας συγκεκριμένης μεθόδου εξαρτάται από την εφαρμογή της και την επιθυμητή ακρίβεια. Την τελευταία δεκαετία, σε συνδυασμό με το LWB, όλο και περισσότερες τεχνικές ανάλυσης επιφάνειας εφαρμόζονται σε μελέτες πνευμονικού επιφανειοδραστικού. Η εφαρμογή αυτών των τεχνικών ανοίγει νέους ορίζοντες στη μελέτη του πνευμονικού επιφανειοδραστικού. Αυτά τα εργαλεία επιτρέπουν την άμεση απεικόνιση μεμβράνης για το σχηματισμό περιοχής, την τοπογραφία, τον μοριακό προσανατολισμό, το ηλεκτρικό δυναμικό επιφάνειας, το πάχος της μεμβράνης, ακόμη και για τις εντοπισμένες

χημικές συνθέσεις. Ο συνδυασμός μετρήσεων σ με πληροφορίες που ελήφθησαν από άμεση απεικόνιση μεμβράνης έχει παράσχει άνευ προηγουμένου εικόνα για τη συμπεριφορά του πνευμονικού επιφανειοδραστικού, όπως η διαπίστωση ότι η μετάβαση/διαχωρισμός φάσης με γνώμονα την πίεση συμβαίνει σε μονοστιβάδες επιφανειοδραστικών και ότι ο σχηματισμός πολυστρωματικών δομών από μονοστιβάδες συμβαίνει σε υψηλό π . Στον παραπάνω πίνακα δεν αναφέρεται η CDS, καθώς είναι νέα μέθοδος και δεν έχει γίνει εκτενής μελέτη σχετικά με τα πλεονεκτήματα – μειονεκτήματα και εφαρμογές της. Σε συνδυασμό με τη μέθοδο AFM, η CDS επέτρεψε τη μελέτη της πλευρικής δομής και της τοπογραφίας κλινικών μεμβρανών πνευμονικού επιφανειοδραστικού που προέρχονται από ζώα σε φυσιολογικά σχετικές χαμηλές επιφανειακές τάσεις.

Έχει επίσης σημειωθεί πρόοδος στον συνδυασμό τεχνικών απεικόνισης μεμβράνης με μετρήσεις σ χρησιμοποιώντας μεθόδους σχηματισμού σταγόνας (drop shape methods). Έχει αποδειχθεί εφικτή η απευθείας εφαρμογή μικροσκοπίου φθορισμού, [90], και ακόμη και μικροσκοπίου δύναμης σάρωσης, [91], στη διεπαφή αέρα-νερού μιας φυσαλίδας με ρυθμιζόμενο μέγεθος. Παρόλο που οι περιορισμοί εξακολουθούν να εμποδίζουν αυτές τις μεθόδους να λειτουργούν ως πλήρως λειτουργική μικροσκοπική ισορροπία Langmuir με ικανότητα απεικόνισης *in situ* μεμβράνης, δεν είναι παράλογο να προβλεφθεί ότι μια τέτοια διάταξη απεικόνισης μίνι ισορροπίας μπορεί να αναπτυχθεί σύντομα. Το CSD θα μπορούσε να προσφέρει μια πολλά υποσχόμενη διαμόρφωση σταγόνας προς αυτή την κατεύθυνση, καθώς η διεπαφή αέρα-νερού στο CSD είναι εύκολα προσβάσιμη σε μικροσκοπικές εγκαταστάσεις. Με τη βοήθεια νέων τεχνικών θα αποκτηθεί περισσότερη γνώση για τη βιοφυσική κατανόηση του πνευμονικού επιφανειοδραστικού και τελικά για την ανάπτυξη νέων σκευασμάτων επιφανειοδραστικών ανθεκτικών στην αναστολή για τη θεραπεία ARDS.

Βιβλιογραφία

- [1] J. B. Grotberg, "Respiratory fluid mechanics", *Physics of Fluids* (1994-present) 23, 021301, 2011.
- [2] W. Hofmann, "Modelling inhaled particle deposition in the human lung—A review", Elsevier, *Journal of Aerosol Science*, Volume 42, Issue 10, October 2011, Pages 693-724, 2011.
- [3] E. Parra, J. P. Gil, "Composition, structure and mechanical properties define performance of pulmonary surfactant membranes and films", Elsevier, *Chem Phys Lipids*, Jan. 2015.
- [4] S. Baoukina and D.P. Tieleman, "Computer simulations of lung surfactant", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1858:2431–2440, 2016.
- [5] K. Bouchoris, "Effect of pulmonary surfactants on alveolar dynamics", School of Engineering Department of Mechanical Engineering, Phd Thesis, University of Thessaly, 2023.
- [6] R.H. Notter, P.R. Chess, and Z. Wang, "Surfactant | overview", In Geoffrey J. Laurent and Steven D. Shapiro *Encyclopedia of Respiratory Medicine*, pages 135 {143. Academic Press, Oxford, 2006.
- [7] J.A. Zasadzinski, J. Ding, H.E. Warriner, F. Bringezu, and Alan J. Waring, "The physics and physiology of lung surfactants", *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 6:506–513, 2001.
- [8] J.A. Clements, "Functions of the alveolar lining", *Am. Rev. of Respir. Dis.*, 115:67–71, 1977.
- [9] S. Schurch, D. Schurch, T. Curstedt, and B. Robertson, "Surface activity of lipid extract surfactant in relation to film area compression and collapse", *J. Appl. Physiol.*, 77(2):974–986, 1994.
- [10] Y. Y. Zuo, R. A.W. Veldhuizen, A. W. Neumann, N. O. Petersen, F. Possmayer, "Current perspectives in pulmonary surfactant — Inhibition, enhancement and evaluation", pp. 1947-19777, Canada, April 2008.
- [11] T.C. Bailey, K.A. Da Silva, J.F. Lewis, K. Rodriguez-Capote, F. Possmayer, R.A. Veldhuizen, "Physiological and inflammatory response to instillation of an oxidized surfactant in a rat model of surfactant deficiency", *J. Appl. Physiol.* 96 (2004) 1674–1680.
- [12] H. Campbell, K. Bosma, A. Brackenbury, L. McCaig, L.J. Yao, R. Veldhuizen, J. Lewis, "Polyethylene glycol (PEG) attenuates exogenous surfactant in lung-injured adult rabbits", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165 (2002) 475–480.
- [13] S. Schurch, H. Bachofen, E.R. Weibel, "Alveolar surface tension in excised rabbit lungs: the effect of temperature", *Respir. Physiol.* 62 (1985) 31–45.

- [14] J.A. Clements, "Surface phenomena in relation to pulmonary function", *Physiologist* 5 (1962) 11–28.
- [15] R.M. Prokop, A.W. Neumann, "Measurement of the interfacial properties of lung surfactant", *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 1 (1996) 677–681.
- [16] E.J. Acosta, R. Gitiafroz, Y.Y. Zuo, Z. Policova, P.N. Cox, M.L. Hair, A.W. Neumann, "Effect of humidity on lung surfactant films subjected to dynamic compression/expansion cycles", *Respir. Physiol. Neurobiol.* 155 (2007) 255–267.
- [17] G. Enhorning, "Pulsating bubble technique for evaluating pulmonary surfactant", *J. Appl. Physiol.* 43 (1977) 198–203.
- [18] C.H. Chang, E.I. Franses, "An analysis of the factors affecting dynamic tension measurements with the pulsating bubble surfactometer", *J. Colloid Interface Sci.* 164 (1994) 107–113.
- [19] S.L. Seuryneck, N.J. Brown, C.W. Wu, K.W. Germino, E.K. Kohlmeir, E.P. Ingenito, M.R. Glucksberg, A.E. Barron, M. Johnson, "Optical monitoring of bubble size and shape in a pulsating bubble surfactometer", *J. Appl. Physiol.* 99 (2005) 624–633.
- [20] S. Schurch, H. Bachofen, J. Goerke, F. Possmayer, "A captive bubble method reproduces the in situ behavior of lung surfactant monolayers", *J. Appl. Physiol.* 67 (1989) 2389–2396.
- [21] G. Putz, M. Walch, M. Van Eijk, H.P. Haagsman, "A spreading technique for forming film in a captive bubble", *Biophys. J.* 75 (1998) 2229–2239.
- [22] J.R. Codd, S. Schurch, C.B. Daniels, S. Orgeig, "Torpor-associated fluctuations in surfactant activity in Gould's wattled bat", *Biochim. Biophys. Acta* 1580 (2002) 57–66.
- [23] J.D. Malcolm, C.D. Elliott, "Interfacial tension from height and diameter of a single sessile drop or captive bubble", *Can. J. Chem. Eng.* 58 (1980) 151–153.
- [24] Y. Rotenberg, L. Boruvka, A.W. Neumann, "Determination of surface-tension and contact-angle from the shapes of axisymmetric fluid interfaces", *J. Colloid Interface Sci.* 93 (1983) 169–183.
- [25] R.M. Prokop, A. Jyoti, M. Eslamian, A. Garg, M. Mihaila, O.I. del Rio, S.S. Susnar, Z. Policova, A.W. Neumann, "A study of captive bubbles with axisymmetric drop shape analysis", *Colloids Surf., A Physicochem. Eng. Asp.* 131 (1998) 231–247.
- [26] Y.C. Liao, O.A. Basaran, E.I. Franses, "Hydrodynamic effects on the oscillations of supported bubbles: implications for accurate measurements of surface properties", *Colloids Surf., A Physicochem. Eng. Asp.* 250 (2004) 367–384.
- [27] Y.C. Liao, O.A. Basaran, E.I. Franses, "Hydrodynamic effects on the oscillations of supported bubbles: implications for accurate measurements of surface properties", *Colloids Surf., A Physicochem. Eng. Asp.* 250 (2004) 367–384.
- [28] H. Trauble, H. Eibl, H. Sawada, "Respiration—a critical phenomenon? Lipid phase transitions in the lung alveolar surfactant", *Naturwissenschaften* 61 (1974) 344–354.
- [29] Y.Y. Zuo, R. Gitiafroz, E. Acosta, Z. Policova, P.N. Cox, M.L. Hair, A.W. Neumann, "Effect of humidity on the adsorption kinetics of lung surfactant at air–water interfaces", *Langmuir* 21 (2005) 10593–10601.
- [30] M. Wulf, S. Michel, K. Grundke, O.I. del Rio, D.Y. Kwok, A.W. Neumann, "Simultaneous determination of surface tension and density of polymer melts using axisymmetric drop shape analysis", *J. Colloid Interface Sci.* 210 (1999) 172–181.
- [31] L.M.Y. Yu, J.J. Lu, Y.W. Chan, A. Ng, L. Zhang, M. Hoorfar, Z. Policova, K. Grundke, A.W. Neumann, "Constrained sessile drop as a new configuration to measure low surface tension in lung surfactant systems", *J. Appl. Physiol.* 97 (2004) 704–715.

- [32] L.M.Y. Yu, J.J. Lu, Y.W. Chan, A. Ng, L. Zhang, M. Hoorfar, Z. Policova, K. Grundke, A.W. Neumann, "Constrained sessile drop as a new configuration to measure low surface tension in lung surfactant systems", *J. Appl. Physiol.* 97 (2004) 704–715.
- [33] G. Enhorning, B.A. Holm, "Disruption of pulmonary surfactant's ability to maintain openness of a narrow tube", *J. Appl. Physiol.* 74 (1993) 2922–2927.
- [34] W. Meier, G. Greune, A. Meyboom, K.P. Hofmann, "Surface tension and viscosity of surfactant from the resonance of an oscillating drop", *Eur. Biophys. J.* 29 (2000) 113–124.
- [35] C. Bertocchi, A. Ravasio, S. Bernet, G. Putz, P. Dietl, T. Haller, "Optical measurement of surface tension in a miniaturized air–liquid interface and its application in lung physiology", *Biophys. J.* 89 (2005) 1353–1361.
- [36] D.Y. Kwok, D. Vollhardt, R. Miller, D. Li, A.W. Neumann, "Axisymmetrical drop shape-analysis as a film balance", *Colloids Surf., A Physicochem. Eng. Asp.* 88 (1994) 51–58.
- [37] L. Xu, X. Yang, Y. Y. Zuo, "Atomic Force Microscopy Imaging of Adsorbed Pulmonary Surfactant Films", *Biophysical Journal*, Volume 119, Issue 4, 18 August 2020, pp. 756–766.
- [38] A. Tsuda, F.S. Henry, and J.B. Butler, "Gas and aerosol mixing in the acinus", *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 163:139, 149, 2008.
- [39] J. Sznitman, "Revisiting air flow and aerosol transport phenomena in the deep lungs with micro fluidics", *Chemical Reviews*, 122:7182, 7204, 2022.
- [40] J. B. Grotberg, "Biofluid Mechanics", *Cambridge Texts in Biomedical Engineering*, Cambridge University Press, 2021.
- [41] H. Zhang, Q. H. Fan, Y.E. Wang, C.R. Neal, Y.Y. Zuo, "Comparative study of clinical pulmonary surfactants using atomic force microscopy", *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 1832–1842, 2011.
- [42] A. Kramer, A. Wintergalen, M. Sieber, H.J. Galla, M. Amrein, R. Guckenberger, "Distribution of the surfactant-associated protein C within a lung surfactant model film investigated by near-field optical microscopy. *Biophys. J.* 78, (2000) 458–465.
- [43] J. Bernardino de la Serna, R. Vargas, V. Picardi, A. Cruz, R. Arranz, J.M. Valpuesta, L. Mateu, J. Perez-Gil, "Segregated ordered lipid phases and protein-promoted membrane cohesivity are required for pulmonary surfactant films to stabilize and protect the respiratory surface. *Faraday Discuss.* 161, (2013a) 535–548.
- [44] B. Robertson, L.M.G. van Golde, J.J. Batenburg, "Pulmonary Surfactant: From Molecular Biology to Clinical Practice, Elsevier, Amsterdam, 1992, pp. 459–484.
- [45] B. Robertson, H.W. Taeusch, "Surfactant Therapy for Lung Disease", Marcel Dekker, New York, 1995, pp. 239–267.
- [46] B. Sun, T. Curstedt, G. Lindgren, B. Franzen, A.A. Alaiya, A. Calkovska, B. Robertson, "Biophysical and physiological properties of a modified porcine surfactant enriched with surfactant protein A", *Eur. Respir. J.* 10 (1997) 1967–1974.
- [47] T. Kobayashi, T. Curstedt, G. Grossmann, B. Robertson, "Inhibition of exogenous surfactant in ventilated immature newborn rabbits", *Respir Physiol* 76 (1989) 1–12.
- [48] T. Yamada, M. Ikegami, A.H. Jobe, "Effects of surfactant subfractions on preterm rabbit lung function, *Pediatr. Res.* 27 (1990) 592–598.
- [49] E.D. Rider, M. Ikegami, J.A. Whitsett, W. Hull, D. Absolom, A.H. Jobe, "Treatment responses to surfactants containing natural surfactant proteins in preterm rabbits", *Am Rev Respir Dis* 147 (1993) 669–676.

- [50] K.E. Pinkerton, M. Ikegami, L.M. Dillard, A.H. Jobe, "Surfactant treatment effects on lung structure and type II cells of preterm ventilated lambs", *Biol. Neonate* 77(2000) 243–252.
- [51] T. Ueda, M. Ikegami, E.D. Rider, A.H. Jobe, "Distribution of surfactant and ventilation in surfactant-treated preterm lambs", *J. Appl. Physiol.* 76 (1994) 45–55.
- [52] G. Putz, J. Goerke, J.A. Clements, "Surface activity of rabbit pulmonary surfactant subfractions at different concentrations in a captive bubble", *J Appl Physiol* 77 (1994) 597–605.
- [53] A.M. Brackenburg, J.L. Malloy, L.A. McCaig, L.J. Yao, R.A. Veldhuizen, J.F. Lewis, "Evaluation of alveolar surfactant aggregates in vitro and in vivo", *Eur. Respir. J.* 19 (2002) 41–46.
- [54] S. Schurch, H. Bachofen, F. Possmayer, "Surface activity in situ, in vivo, and in the captive bubble surfactometer", *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 129 (2001) 195–207.
- [55] V. Im. Hof, P. Gehr, V. Gerber, M.M. Lee, S. Schurch, "In vivo determination of surface tension in the horse trachea and in vitro model studies", *Respir. Physiol.* 109 (1997) 81–93.
- [56] O. N. Oliveira Jr., L. Caseli, and K. Ariga, "The Past and the Future of Langmuir and Langmuir–Blodgett Films", *Chemical Reviews* 2022 122 (6), (2022) 6459–6513.
- [57] E. Parra and J. Perez-Gil, "Composition, structure and mechanical properties define performance of pulmonary surfactant membranes and films", *Chemistry and Physics of Lipids*, 185:153–175, 2015.
- [58] S. Schurch, "Surface tension properties of surfactant", *Clin. Perinatol.* 20 (1993) 669–682.
- [59] C. O. Ciutara, S. Barman, S. Iasella, B. Huang, and J. A. Zasadzinski, "Dilatational and shear rheology of soluble and insoluble monolayers with a langmuir trough" *Journal of Colloid and Interface Science*, 629:125–135, 2023.
- [60] S.B. Hall, M.S. Bermel, Y.T. Ko, H.J. Palmer, G. Enhorning, R.H. Notter, "Approximations in the measurement of surface tension on the oscillating bubble surfactometer", *J. Appl. Physiol.* 75 (1993) 468–477.
- [61] G. Putz, J. Goerke, S. Schurch, J.A. Clements, "Evaluation of pressure-driven captive bubble surfactometer", *J. Appl. Physiol.* 76 (1994) 1417–1424.
- [62] Y.C. Liao, O.A. Basaran, E.I. Franses, "Effects of dynamic surface tension and fluid flow on the oscillations of a supported bubble", *Colloids Surf., A Physicochem. Eng. Asp.* 282 (2006) 183–202.
- [63] J.N. Hildebran, J. Goerke, J.A. Clements, "Pulmonary surface film stability and composition", *J. Appl. Physiol.* 47 (1979) 604–611.
- [64] J. Goerke, J. Gonzales, "Temperature dependence of dipalmitoyl phosphatidylcholine monolayer stability", *J. Appl. Physiol.* 51 (1981) 1108–1114.
- [65] O. Albrecht, H. Gruler, E. Sackmann, "Polymorphism of phospholipid monolayers, *J. Phys. (Paris)* 39 (1978) 301–313.
- [66] G. Brezesinski, H. Mohwald, "Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces", *Adv. Colloid Interface Sci.* 100–102 (2003) 563–584.
- [67] L.K. Nielsen, T. Bjornholm, O.G. Mouritsen, "Thermodynamic and real-space structural evidence of a 2D critical point in phospholipid monolayers", *Langmuir* 23 (2007) 11684–11692.

- [68] W. Yan, S.C. Biswas, T.G. Laderas, S.B. Hall, "The melting of pulmonary surfactant monolayers", *J. Appl. Physiol.* 102 (2007) 1739–1745.
- [69] J.M. Crane, G. Putz, S.B. Hall, "Persistence of phase coexistence in desaturated phosphatidylcholine monolayers at high surface pressures", *Biophys. J.* 77 (1999) 3134–3143.
- [70] S. Schurch, F.H.Y. Green, H. Bachofen, "Formation and structure of surface films: captive bubble surfactometry", *Biochim. Biophys. Acta* 1408 (1998) 180–202.
- [71] K. Yu, J. Yang, and Y. Y. Zuo, "Automated droplet manipulation using closed-loop axisymmetric drop shape analysis", *Langmuir*, (2016) 32:4820–4826.
- [72] Xu, L., G. Bosiljevac, Y. Y. Zuo. 2018, "Melting of the dipalmitoylphosphatidylcholine Monolayer", *Langmuir*, (2018) 34:4688–4694.
- [73] Cruz, A., and J. Perez-Gil, "Langmuir films to determine lateral surface pressure on lipid segregation", *Methods Mol. Biol.* (2007) 400:439–457.
- [74] N. Wüstneck, R. Wüstneck, U. Pison, "Surface dilatational behavior of pulmonary surfactant components spread on the surface of a captive bubble. 3. Dipalmitoyl phosphatidylcholine, surfactant protein C, and surfactant protein B", *Langmuir* 19, (2003) 7521–7527.
- [75] N. Wustneck, R. Wustneck, J. Perez-Gil, U. Pison, "Effects of oligomerization and secondary structure on the surface behavior of pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C", *Biophys. J.* 84, (2003) 1940–1949.
- [76] D. Grigoriev, J. Krägel, A. Akentiev, B. Noskov, R. Miller, U. Pison, "Relation between rheological properties and structural changes in monolayers of model lung surfactant under compression", *Biophys. Chem.* 104, (2003) 633–642.
- [77] Alonso, C., T. Alig, J. Yoon, F. Bringezu, H. Warriner, J.A. Zasadzinski, "More than a monolayer: relating lung surfactant structure and mechanics to composition", *Biophys. J.* 87, (2004) 4188–4202.
- [78] F. Bringezu, J.Q. Ding, G. Brezesinski, A.J. Waring, J.A. Zasadzinski, "Influence of pulmonary surfactant protein B on model lung surfactant monolayers" *Langmuir* 18, (2002) 2319–2325.
- [79] L.M. Yu, J.J. Lu, Y.W. Chan, A. Ng, L. Zhang, M. Hoorfar, Z. Policova, K. Grundke, A.W. Neumann, "Constrained sessile drop as a new configuration to measure low surface tension in lung surfactant systems", *J. Appl. Physiol.* (1985) 97, 704–715.
- [80] M. Rudiger, A. Tolle, W. Meier, B. Rustow, "Naturally derived commercial surfactants differ in composition of surfactant lipids and in surface viscosity", *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 288, (2005) L379–L383.
- [81] M. Cordova, A.J. Mautone, E.M. Scarpelli, "Rapid in vitro tests of surfactant film formation: advantages of the Exerowa black film method", *Pediatr. Pulmonol.* 21, (1996) 373–382.
- [82] D. Exerowa, Z. Lalchev, "Bilayer and multilayer foam films – model for study of the alveolar surface and stability", *Langmuir* 2, (1986) 668–671.
- [83] D. Exerowa, Z. Lalchev, D. Kashchiev, "Stability of foam lipid bilayers of amniotic-fluid", *Colloids Surf.* 10, (1984) 113–121.
- [84] P. Tchoukov, E. Mileva, D. Exerowa, "Experimental evidences of self-assembly in foam films from amphiphilic solutions", *Langmuir* 19, (2003) 1215–1220.
- [85] D. Exerowa, P.M. Kruglyakov, "Foams and foam films: theory, experiment, application", *Stud. Interface Sci.* 5, 1998.

- [86] R. Cohen, R. Todorov, G. Vladimirov, D. Exerowa, "Effect of rhamnolipids on pulmonary surfactant foam films", *Langmuir* 26, (2010) 9423–9428.
- [87] Saad, S. M. I. and Neumann, A. W. "Axisymmetric Drop Shape Analysis (ADSA): An Outline", *Advances in Colloid and Interface Science* 238, (2016) 62-87.
- [88] O. N. Oliveira, L. Caseli and K. Ariga "The Past and the Future of Langmuir and Langmuir–Blodgett Films", *Chemical Reviews* 122, (2022) 6459-6513.
- [89] J.H. Comroe Jr., "Premature science and immature lungs. Part III. The attack on immature lungs, Am". *Rev. Respir. Dis.* 116 (1977) 497–518.
- [90] D. Knebel, M. Sieber, R. Reichelt, H.J. Galla, M. Amrein, "Fluorescence light microscopy of pulmonary surfactant at the air–water interface of an air bubble of adjustable size", *Biophys. J.* 83 (2002) 547–555.
- [91] D. Knebel, M. Sieber, R. Reichelt, H.J. Galla, M. Amrein, "Scanning force microscopy at the air–water interface of an air bubble coated with pulmonary surfactant", *Biophys. J.* 82 (2002) 474–480.