

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ФИЗИКОХИМИЯ
„АКАД. РОСТИСЛАВ КАИШЕВ“**

Свободан Александров Александров

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ В ТЪНКИ ТЕЧНИ ФИЛМИ ОТ
ФОСФОЛИПИДИ И СПЕЦИФИЧНИ ПОЛИМЕРИ НА
АЛВЕОЛАРНИЯ СЪРФАКТАНТ**

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНАТА И
НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“

Направление 4.2. Химически науки

Докторска програма „Физикохимия“

Научен ръководител: акад. проф. Дочи Ексерова

Научен консултант: чл. кор. проф. Здравко Лалчев

София, 2019 г.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширено заседание на колоквиум „Алексей Шелудко“ към секция „Повърхности и колоиди“ на Института по физикохимия на БАН, състояло се на 29 ноември 2019 г.

Дисертацията съдържа 98 страници, 92 фигури, 7 таблици и 18 уравнения. Цитираната литература е от 104 източника. Номерата на фигурите в дисертационния труд и автореферата съвпадат.

Защитата ще се състои на от 16 ч. в заседателната зала на втори етаж на бл. 11, ул. „Акад. Георги Бончев“ на открито заседание на Научното жури.

Материалите са на разположение на интересуващите се в канцеларията на Института по физикохимия (стая 402), както и на Интернет страницата на ИФХ – БАН (<http://www.ipc.bas.bg/PhD/index.html/>).

1. Въведение

Повърхностно активното поведение на веществата, покриващи алвеолите в белия дроб (алвеоларен сърфактант (АС)) е обект на засилен интерес от десетилетия. АС представлява липопротеинов комплекс, покриващ алвеолите в тънък слой като основната му функция е да намалява повърхностното напрежение при издишване на границата алвеоларен въздух-хипофаза [1]. В състава на АС влизат както липиди (главно фосфолипиди), така и протеини като четири от тях (SP-A, SP-B, SP-C и SP-D) са специфични за него [2]. Сред техниките, използвани при изучаването на състава на АС е изолирането и изследването на свойствата на различни фракции от него. Такава е хидрофобната фракция AS-B от лаваж на свински бели дробове. Недостигът на количеството на АС, както и отклонения в оптималния му биохимичен състав, нарушават нормалната респираторна дейност. Най-сериозното такова нарушение е респираторният дистрес синдром (РДС). РДС е една от главните причини за заболяемостта и смъртността на недоносени новородени бебета [3]. Увреждания на сърфактантната функция играят важна роля и в етиологията на РДС при възрастни [4].

При терапията на РДС се използват естествени и синтетични терапевтични сърфактантни препарати (ТСП), прилагането на които има за цел да компенсира недостига на АС. Сред най-използваните естествени такива са Curosurf, Infasurf, Exosurf, Survanta и др.

Изучаването на повърхностните свойства на ТСП на границата воден разтвор/въздушна фаза е свързано с характеризиране на сърфактантите чрез определяне на повърхностното напрежение на фазовата граница. Същевременно методът на образуването на тънки течни филми/черни филми (ТТФ) също показва отлични възможности за проследяване на поведението на ТСП [5-9]. Предимството му е в проследяване на образуването на би- и мултислойни структури. Стабилността на фосфолипидните ТТФ, както и ТТФ от ТСП може да се определи експериментално чрез изследване вероятността за образуване на стабилен филм (W) от концентрацията на веществото (C).

Инактивацията на АС като цяло се свързва с разнообразни фактори – навлизане на серумни белтъци в алвеоларния лумен, недостиг на АС, намаляване на количеството на тоталните фосфолипиди, DPPC, DPPG, SP-A и др. Един от слабоизучените фактори, които засягат активността, е присъствието на ниски концентрации лизолипиди [10]. Лизолипидите са продукт от хидролизата на фосфолипидните молекули. Така например, фосфолипаза А₂ (PLA₂) е водоразтворим ензим и в резултат на ензимно-каталитичното й действие настъпва хидролиза на DPPC до лизолипид (lyso PC) и палмитинова киселина (PA).

1.2. Литературен обзор

Тази глава включва кратко разглеждане на същността на алвеоларния сърфактант (АС) и факторите, които водят до инхибирането му, включително ролята на лизолипидите. Разгледани са терапевтични екзогенни сърфактантни препарати, използвани в дисертацията. Дадена е информация за използването на тънките течни филми и монослойната техника в изучаването на сърфактанта. Посочени са случаи на изучаването на АС, сърфактантни препарати и лизолипиди в присъствие на Ca^{2+} от други автори.

1.3. Цел и задачи

Основна цел на настоящата работа е:

- да се изследва влиянието на заредени (lyso PG) и незаредени (lyso PC) лизолипиди върху физикохимичните свойства на естествени терапевтични сърфактантни препарати (Infasurf и Curosurf) с помощта на тънки течни филми и монослой;
- да се провери влиянието на електролита (Na^+ и Ca^{2+} йони) върху стабилността на тънките течни филми и поведението на монослоеве при компресия/декомпресия;
- да се изследват експериментално свойствата на тънки течни филми от AS-B като функция от концентрацията на електролит (C_{el}) и директно измерване на изотерми на разклинящо налягане ($\Pi(h)$) за различни типове филми, получени от AS-B.

За постигането на тази цел бяха формулирани следните задачи:

- да се намерят C_c и C_t стойностите за лизолипидите и сърфактантните препарати
- да се провери как ниски концентрации лизолипиди повлияват стабилността на тънките течни филми от сърфактантни препарати в смес в присъствие на моно- и бивалентни йони
- да се изследва времето за разтичане на лизолипидите и смесите с терапевтични сърфактантни препарати
- да се изследват динамичните изотерми на повърхностното напрежение на чистите лизолипиди и смесите им с терапевтичните сърфактантни препарати
- да се изследва зависимостта на тънките течни филми от AS-B от концентрацията на NaCl и на базата на получените резултати да се подберат концентрации, при които да се извърши директно измерване на силите на взаимодействие чрез изотерми на разклинящо налягане.

2. Материали и методи

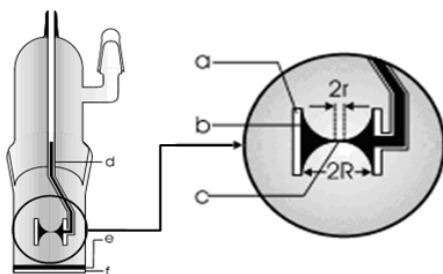
При експериментите в дисертацията са използвани два лизолипида – лизофосфатидилхолин (lyso PC) и лизофосфатидилглицерол (lyso PG), както и два

екзогенни сърфактантни препаратата – Infasurf и Curosurf. Използвана е и хидрофобна фракция на АС от свински бели дробове (AS-B).

За приготвяне на всички разтвори и разреждания е използвана дестилирана вода (специфична проводимост $1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). Като електролити са използвани NaCl (Merck >99,99%, обработен при 500°C с цел отстраняване на евентуални органични примеси) и CaCl_2 (Merck, $\text{CaCl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, >99%).

Електролитната концентрация на всички работни разтвори е проверявана с кондуктометър след края на всяко измерване. Работната температура при всички експерименти с лизолипиди и ТСП е 22°C , а при тези с AS-B е 23°C .

Изследванията с ТТФ са извършени с помощта на микроинтерферометричния метод на Шелудко-Ексерова [78].

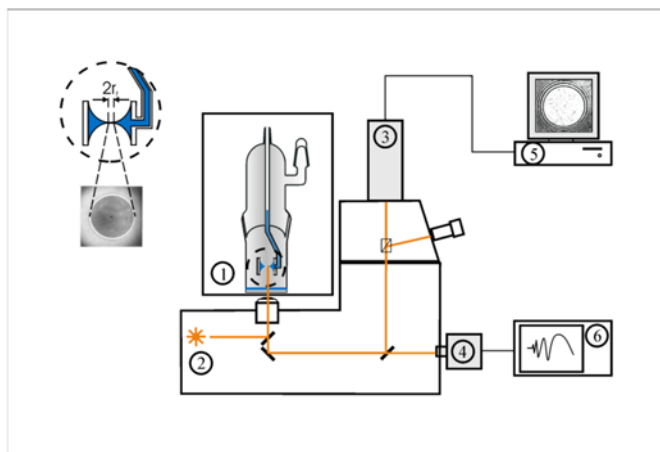


Фигура II-1: Схема на клетката на Шелудко-Ексерова за изследване на микроинтерферометрични ТТФ. Означения: *a* - цилиндърче (държач на филма); *b* – двойно вдлъбнатата капка; *c* – микроинтерферометричен ТТФ; *d* – стъклена капилляра; *e* – сърфактантен разтвор; *f* – оптическо плоско стъкло; *g* – пореста пластинка.

В стъклената клетка на Шелудко-Ексерова (фигура II-1) пенният филм с радиус $0,1 \text{ mm}$ се образува при изтегляне на течност в стъклената капилляра от цилиндърчето с радиус $R = 2 \text{ mm}$, в което е двойно вдлъбнатата капка. Филмът се образува при капиллярно налягане $P = 2\sigma/R$, където σ е повърхностното напрежение на разтвора. Дъното на клетката се покрива с тънък слой от изследвания разтвор, за да се осигури насищане на обема на клетката с парите на разтвора и да се предотврати изпарението на филма. При означения на фигура II-1 вариант на клетката на Шелудко-Ексерова изследването на ТТФ става при постоянно капиллярно налягане, което е подходящо за изследване на равновесни и динамични характеристики.

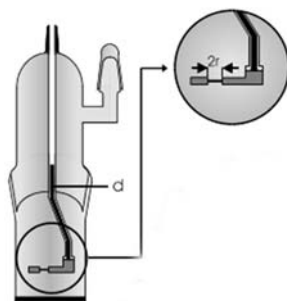
По време на наблюденията на ТТФ клетката се намира в специална камера, в която температурата се поддържа постоянна с точност $\pm 0.1^\circ\text{C}$ с помощта на термостат. Температурата в лабораторията също се поддържа с точност $\pm 1^\circ\text{C}$.

Цялостната апаратура за наблюдението на ТТФ е представена на фигура II-3.



Фигура II-3. Схема на опитната установка за изследване на ТТФ с клетка на Шелудко-Ексерова и допълнена с възможност за видео регистрация и обработка на изображението. 1) Клетка, с получен в нея пенен филм, поставена в термостатираща камера. 2) Микроскоп. 3) CCD-камера. 4) Фотоумножител. 5) Компютър с хардуер и софтуер за обработка на изображенията. 6) $I(t)$ -рекордер. [100]

Провеждането на изследването на ТТФ при промяна на налягането, както и при директно определяне на силите на взаимодействие се проведе с помощта на модифицирания вариант на клетката на Шелудко-Ексерова – клетка с пореста пластинка (фигура II-4).



Фигура II-4. Модифициран вариант на клетката на Шелудко-Ексерова с пореста пластинка за директно измерване на силите на взаимодействие

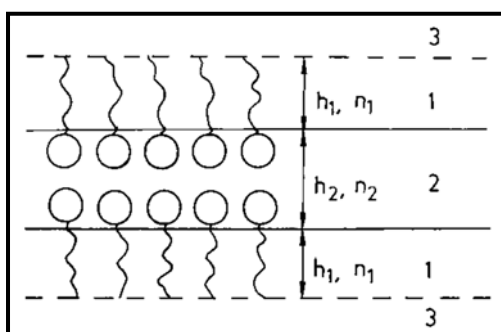
Дебелината на ТТФ се определя от отношението на интензитета на отразената монохроматична светлината (I), съответстващ на точно определена дебелина и интензитета на интерференционния максимум (I_{\max}) според формулата:

$$h_w = \frac{\lambda}{2\pi n} \left(k\pi \pm \arcsin \sqrt{\frac{I / I_{\max}}{1 + [(n^2 - 1) / 2n]^2 (1 - I / I_{\max})}} \right) \quad (15)$$

където h_w е т.нар. еквивалентна дебелина на ТТФ т.е. дебелина на филма с коефициент на пречупване на разтвора n .

Точността на измерването на дебелината с микроинтерферометричната техника е ± 0.2 nm. За по-тънки филми (< 30 nm) е необходимо да се отчита също и структурата на филма. При изчисляването е взет предвид трислойният модел на филма (фигура II-5) с дебелина на водната прослойка h_2 и индекс на пречупване n_2 два хомогенни слоя от адсорбиран сърфактант с дебелина h_1 всеки и индекс на пречупване n_1 [78, 97-99] Съгласно формулата на Duуivis за трислойният модел дебелината на h_2 се намира по формулата:

$$h_2 = h_w - 2h_1 \frac{n_1^2 - 1}{n_2^2 - 1} \quad (16)$$



Фигура II-5. Трислойн модел на ТТФ: 1 - органична фаза; 2 – водна фаза; 3 – въздух; [78]

Вероятността (W) за образуване на ЧФ при дадена сърфактантна концентрация е определян експериментално по формулата $W = \frac{\Delta N}{N}$, където ΔN е броят на опитите, в които ЧФ се образуват, а N е общ брой на проведените опити. Вероятността за наблюдение на ЧФ варира в интервала от 0 до 1.

Изследванията с монослой бяха извършени с помощта на везна на Лангмюир. Принципното устройство на везната на Лангмюир-Вилхелми включва вана, в която се образува монослой от изследваното вещество върху течна подложка и чиято повърхност може да се променя с помощта на подвижна бариера. Определянето на повърхностното напрежение става по метода на Вилхелми чрез пластинка или игла, потопена в подложката, която е свързана с прецизна везна. Отчита се силата (F), с която пластинката се притегля от подложката. Измерването на повърхностното напрежение се основава на уравнението на Юнг:

$$F = \sigma L \cos \theta \quad (17)$$

където σ е повърхностното напрежение, L – периметърът на контактната линия на пластинката с подложката, θ е ъгълът на омокряне. Чрез този метод могат да се изследват както адсорбционни, така и неразтворими монослое. Определянето на повърхностното (двумерно) налягане π става на базата на връзката му с повърхностното напрежение съгласно формулата:

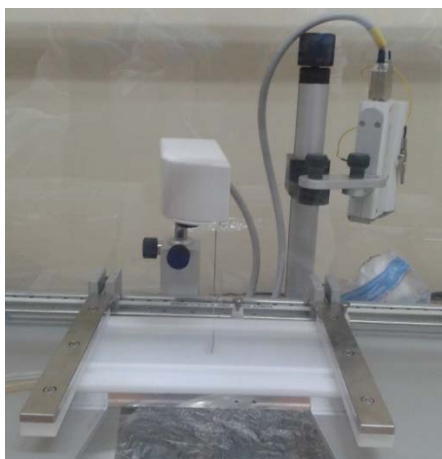
$$\pi = \sigma_0 - \sigma \quad (18)$$

За измерванията на повърхностното налягане бяха използвани два апарата. Част от експериментите, проведохме на компютърно контролирана тензиометрична везна на Лангмюир (Kibron, Хелзинки, Финландия). Тя е оборудвана с μ Trough XL вана, (повърхностна площ 236 cm^2 , обем 40 ml) и е използвана за измерване на $\pi(A)$ -изотермите по модифициран метод на Вилхелми (чрез платинена игла).



Фигура II-6. Везна на Лангмюир - Kibron Microtrough -X (Kibron, Inc., Helsinki, Finland)

Вторият използван апарат е KSV NIMA Langmuir Trough.



Фигура II-7. Везна на Лангмюир KSV NIMA

И при двата измервателни уреда са ползвани термостати за поддържане на необходимата температура. По време на циклите при компресия/декомпресия непрекъснато е проследявано изменението на повърхностното налягане. С помощта на специализиран софтуер са получени данните за изменение на повърхностното налягане от времето (π/time) и повърхностно налягане от площта на монослоя (π/area).

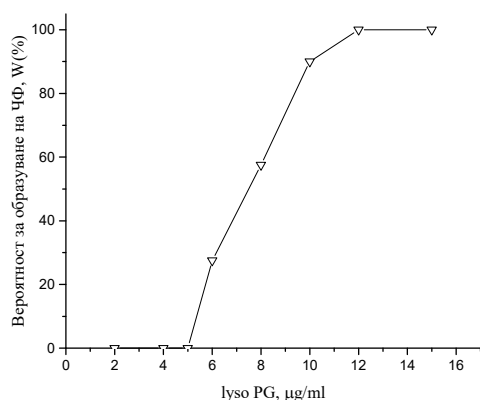
3. Тънки течни филми от лизолипиди и терапевтични сърфактантни препарати

3.1. Тънки течни филми от lyso PC

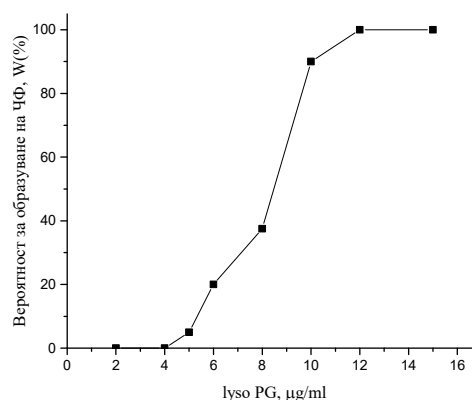
Изследвана е вероятността за получаване на черни филми (W) от концентрацията на lyso PC (C) в присъствие на $0.15 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ NaCl}$ и $0.1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$ при температура 22°C . И при двата електролита стабилни ОЧФ се получават при концентрации на лизолипида над $12 \mu\text{g/ml}$. Измерените равновесни дебелини на черните филми при различни концентрации на сърфактанта показват, че при CaCl_2 филмите имат с $\sim 2 \text{ nm}$ по-голяма дебелина.

3.2. Тънки течни филми от lyso PG

Изследвана беше зависимостта на вероятността за образуване на черни филми (W) от концентрацията на lyso PG в присъствие на $0.15 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ NaCl}$ и $0.1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$ при температура 22°C . Експериментите в присъствие на $0.15 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ NaCl}$ показаха, че не се наблюдава образуването на ОЧФ при концентрация $4 \mu\text{g/ml}$ сърфактант (фигури III-3а и III-3б). При $12 \mu\text{g/ml}$ lyso PG всички филми още на 30-ата минута изтичат до стабилни ОЧФ.



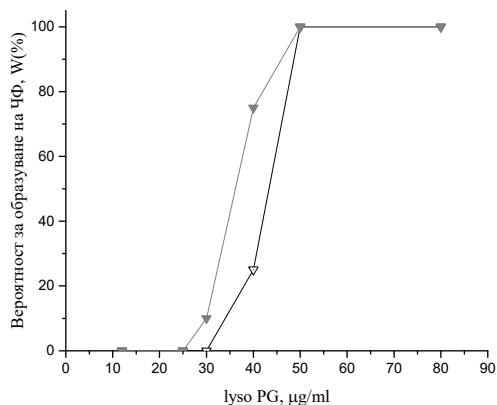
Фигура III-3а. Зависимост на вероятността за образуване на черни филми от концентрацията на lyso PG. Измерванията са проведени след 30 минути от зареждането на разтвора в присъствие на $0.15 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ NaCl}$, $T = 22^\circ\text{C}$.



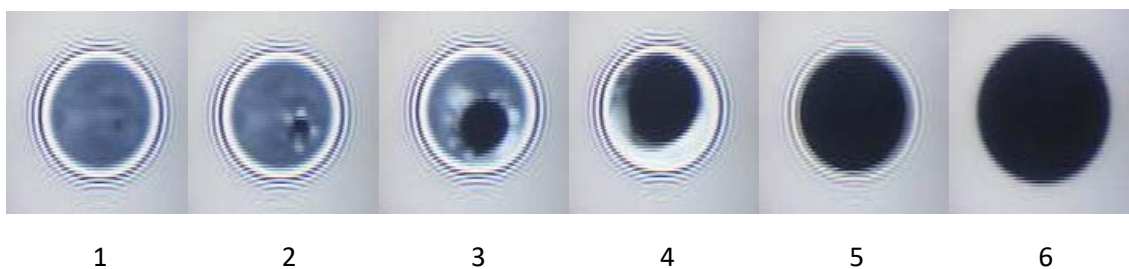
Фигура III-3б. Зависимост на вероятността за образуване на черни филми от концентрацията на lyso PG. Измерванията са проведени след 60 минути от зареждането на разтвора в присъствие на $0.15 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ NaCl}$, $T = 22^\circ\text{C}$.

При промяна в използвания електролит – $0.1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$ вероятността за образуване на черни филми (W) се отмества концентрационно, както се променя и типът на черните филми, които се наблюдават – НЧФ. Сравнявайки измерените дебелини на филмите от lyso PG в присъствие на $0.1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$ с тези в присъствие на $0.15 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ NaCl}$ се вижда, че първите са забележимо по-тънки при по-висока концентрация на сърфактант. Интересен резултат бе наблюдаваният преход към НЧФ по време на изтъняването на

филмите от lyso PG с $0.1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$, показан на фигура III-5. Получаването на НЧФ става в изключително кратък времеви интервал – времето между първия и последния кадър, които се виждат на фигурата е само 0.2 s.

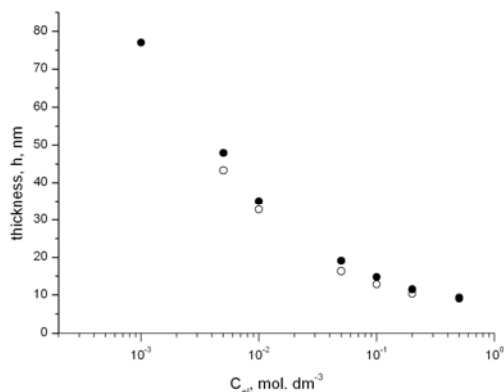


Фигура III-4. Зависимост на вероятността за образуване на черни филми от концентрацията на lyso PG. Измерванията са проведени след 30 минути (бели триъгълници) и 60 минути (сини триъгълници) от зареждането на разтвора в присъствие на $0.1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$, $T = 22^\circ\text{C}$.



Фигура III-5. Преход на ТТФ от сив в НЧФ - lyso PG ($50 \mu\text{g/ml}$) в присъствие на $0.1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$. Времеви интервали между отделните кадри са, както следва: 1 – 0.00 s, 2 – 0.04 s, 3 – 0.08 s, 4 – 0.12 s, 5 – 0.16 s, 6 – 0.2 s

Изследвана беше зависимостта на дебелината на черните филми от концентрацията на електролит като бяха направени измервания и с двата използвани по-рано електролита – NaCl и CaCl_2 . При изследването в присъствие на NaCl бяха проведени измервания при две различни концентрации на lyso PG (C_s) – $12 \mu\text{g/ml}$ ($C_s = 2.4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) и $80 \mu\text{g/ml}$ ($C_s = 1.5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$). Резултатите са представени графично на фигура III-6.

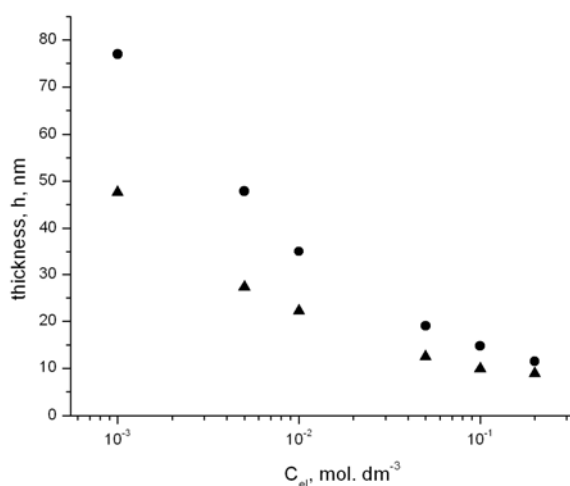


Фигура III-6. Равновесни дебелини (h , nm) на ТТФ от lyso PG (C_s) като функция от концентрацията на NaCl (C_{el}):

○ $C_s = 2.4 \times 10^{-6} \text{ mol.dm}^{-3}$; ● $C_s = 1.5 \times 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$.

И при двете сърфактантни концентрации при ниска концентрация на електролит се образуват дебели ТТФ, които с увеличаване на C_{el} изтъняват постепенно. При $C_{el} = 5 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ се наблюдава преход към образуване на ОЧФ. По-нататъшното увеличаване на C_{el} не води до промяна в типа на филмите. Дебелината им съвсем слабо намалява, достигайки до $\sim 9 \text{ nm}$ при $0.5 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$. При по-високата концентрация на lyso PG зависимостта на дебелината на ТТФ от електролита следва същата тенденция, но графиката лежи над тази на по-ниската сърфактантна концентрация. Тези резултати са в съгласие с други изследвания, показали, че при смеси на заредени и незаредени липиди дебелината на изследваните филми се увеличава с нарастване на концентрацията на заредения сърфактант [101].

Зависимостта на равновесните дебелини (h , nm) на ТТФ от lyso PG като функция от концентрацията на CaCl_2 (фигура III-7) показва сходна тенденция, както при показаната по-горе графика с използването на NaCl като електролит. Равновесните дебелини на ТТФ от lyso PG намаляват с увеличаване на концентрацията на CaCl_2 .

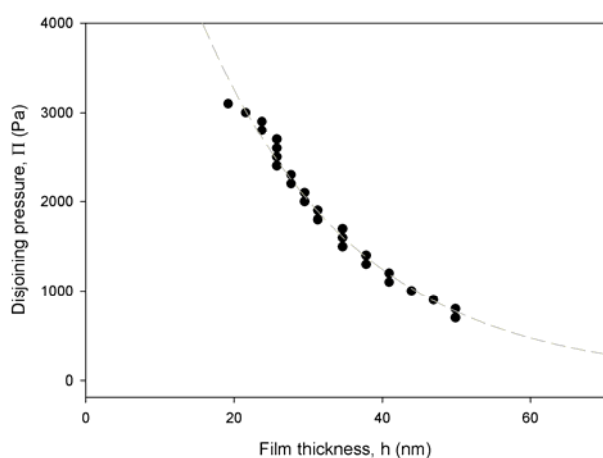


Фигура III-7. Равновесни дебелини (h , nm) на ТТФ от lyso PG ($C_s = 1.5 \times 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$) като функция от концентрацията на CaCl_2 (▲). За сравнение са дадени данните при същата C_s за lyso PG от предходната фигура при използване на NaCl като електролит (●)

В този случай обаче, удебеляването на филмите при намаляване концентрацията на електролита е по-слабо изразено. Възможно обяснение на наблюдавания ефект е във взаимодействието между заредените глави на лизозипидите и двувалентните калциеви йони, което в крайна сметка да води до образуването на ТТФ с по-малка дебелина.

Получени бяха изотерми на разклинящо налягане в присъствие на $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3} \text{ NaCl}$ и $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$, представени графично по-долу. (фигури III-8 и III-9). Както се вижда от фигура III-8, увеличаването на приложеното налягане води до постепенно намаляване на равновесните дебелини на ТТФ. При налягане 3.1 kPa измерихме дебелина на филма $\sim 19 \text{ nm}$. Ходът на получената изотерма с добавен CaCl_2 , показан на фигура III-

9, е подобен на получения с NaCl. Дебелината на филма при налягане 3.1 kPa, която измерихме, е по-малка в сравнение с тази при NaCl и е от порядъка на ~ 14.5 nm.



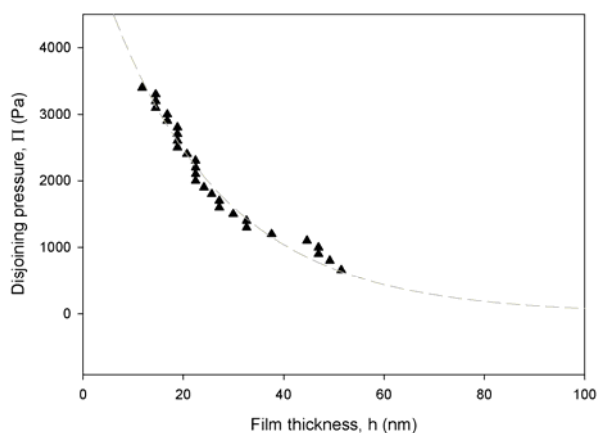
Фигура III-8. $\Pi(h)$ изотерма (с насочваща линия), измерена при lyso PG с $C_s = 1.5 \times 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ (80 $\mu\text{g/ml}$) с добавен NaCl с концентрация $1 \times 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$.

Съгласно класическата DLVO теория сме в състояние да определим потенциала на дифузия електричен слой φ_0 на повърхностите на филма на базата на следното уравнение [102]:

$$\kappa^{-1} = \left(\frac{\varepsilon_0 \varepsilon k T}{2 \rho_{\infty i} z_i^2 e^2} \right) \quad (19)$$

където κ^{-1} е Дебаевата дължина, k е константата на Болцман, T – абсолютната температура, ρ е плътността на заряда, z е заряда на йона, а e е заряда на електрона. Получената стойност за φ_0 при измерването с NaCl е 2.45 mV, а при използване на CaCl_2 – 1.7 mV. При ниски потенциали със стойности под 25 mV [67] потенциалът става пропорционален на повърхностния плътностен заряд. Големината на Дебаевата дължина зависи само от свойствата на разтвора, но не и от някои от свойствата на повърхността (като заряд или потенциал). За разтворите с калциеви йони стойността на κ съгласно направените допускания е 0.08 nm^{-1} , а на база експерименталните резултати е два пъти по-ниска – 0.04 nm^{-1} . При преизчисляване на концентрацията на калциевите йони на базата на теорията за Дебаевата дължина получихме много ниска стойност – $6.10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$. Данните сравнени с ниския потенциал на разтвора на Ca^{2+} могат да бъдат интерпретирани с последващото взаимодействие между двувалентните йони и фосфатните остатъци на полярната глава на лизолипидните молекули [67]. На базата и на други изследвания [103] при липиди с отрицателно-заредени полярни глави нашият експеримент потвърждава, че Ca^{2+} имат съществено влияние върху природата на бислойната повърхност. Вероятно, освен взаимодействията в двойния слой и други по-

специфични фактори като възникване на „мостчета“ и конформационни промени играят важна роля при изтъняването на филма.



Фигура III-9. $\Pi(h)$ изотерма (с насочваща линия), измерена при lyso PG с концентрация $C_s = 1.5 \times 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ ($80 \mu\text{g/ml}$) в присъствие на CaCl_2 с концентрация $2 \times 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$

3.3. Тънки течни филми от Infasurf

Зависимостта на вероятността (W) за наблюдаване на черни филми от концентрацията на сърфактантния терапевтичен препарат Infasurf (C) е съществена за начина на образуването на черните филми. Получената стойност за $C_t = 75 \mu\text{g/ml}$ бе използвана като ориентир при по-нататъшните експерименти за получаване на ТТФ от разтвори, съдържащи смес на Infasurf и lyso PC, както и при експериментите с монослой. Тези резултати са много близки до представените от Тодоров, Ексерова и сътр. [83], засегнати в литературния обзор.

3.4. Тънки течни филми от Curosurf

Изследвахме зависимостта на вероятността за образуване на черни петна/черни филми (W) от концентрацията (C) на разтвори, съдържащи терапевтичния сърфактантен препарат Curosurf в присъствие на $0.15 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ NaCl}$ и $0.1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$. Получените резултати за C_c и C_t са съответно: $C_c = 80 \mu\text{g/ml}$ и $C_t = 160 \mu\text{g/ml}$ (на 30-та минута) и $C_c = 60 \mu\text{g/ml}$ и $C_t = 120 \mu\text{g/ml}$ (на 60-та минута). Стойностите са по-високи от изложените от Тодоров, Ексерова и сътр. [83], но тук трябва да се отчете и влиянието на температурата, която в нашия случай е 22°C .

Измерени бяха и дебелините на получените ОЧФ при високите концентрации. Средната дебелина е 13.5 nm , която стойност е в съгласие с резултатите на Тодоров и сътр. [83]. Установихме, че дебелината на ТТФ не се влияе от нарастването на концентрацията на Curosurf.

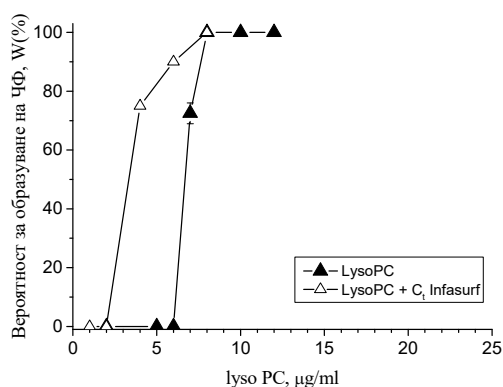
При изследване в присъствие на $0.1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$ бяха установени стойностите на C_c и C_t , които бяха взети под внимание при по-нататъшните експерименти за получаване на

ТТФ от смеси между Curosurf и лизолипида. Стойностите за C_c съвпадат с тези при използването на NaCl, докато C_t на 60-ата минута е отместена на 140 $\mu\text{g/ml}$.

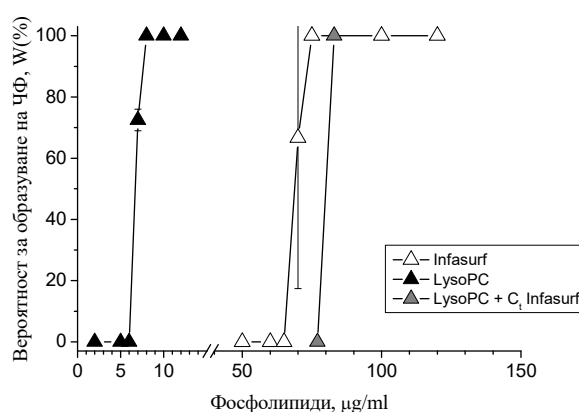
Бяха измерени и дебелините на получените черни филми като средната стойност е 10.5 nm. Прави впечатление, че дебелината на черните филми е с ~ 3 nm по-малка при използването на CaCl_2 като електролит, а вероятна причина за този факт е взаимодействието на Ca^{2+} с молекулите на сурфактанта.

3.5. Смесени филми – lyso PC и Infasurf

Смесените пенни филми от lyso PC и Infasurf и най-вече тяхната стабилност могат да послужат като ориентир за влиянието на лизолипида върху АС и в частност – ТСП. Фигури III-15a и III-15b отразяват резултатите от подробното изследване на влиянието на lyso PC върху стабилността на филмите от Infasurf ($C_t = 75 \mu\text{g/ml}$). Добавянето на малки количества lyso PC (2 $\mu\text{g/ml}$) води до дестабилизация на получаването на черни филми ($W=0\%$). Ефектът на дестабилизация се наблюдава в концентрационния интервал за лизолипида между 2 и 8 $\mu\text{g/ml}$. За концентрации от lyso PC над 8 $\mu\text{g/ml}$ получихме стабилни черни филми, вероятно поради образуването на адсорбционни слоеве.



Фигура III-15a. Зависимост на вероятността за образуване на ОЧФ от lyso PC (запълнените триъгълници) и смесите с Infasurf (отворените триъгълници) от концентрацията на lyso PC. Експериментите са проведени при 0.15 mol.dm^{-3} NaCl, $T = 22^\circ\text{C}$ след 30 минути



Фигура III-15b. Зависимост на вероятността за образуване на ОЧФ – сравнение между чист lyso PC, чист Infasurf и тяхна смес. Експериментите са проведени при 0.15 mol.dm^{-3} NaCl, $T = 22^\circ\text{C}$ след 30 минути

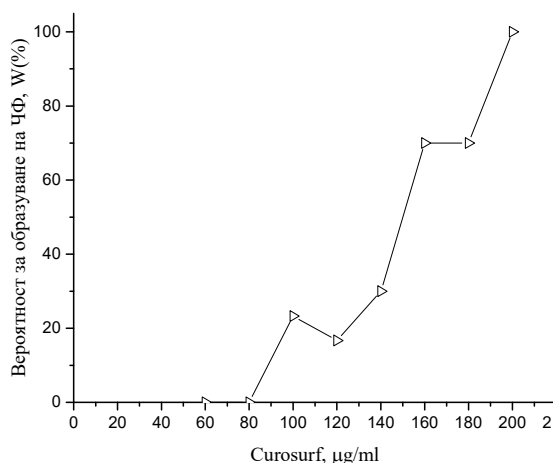
3.6. Смесени филми от lyso PC и Curosurf

Чрез смесените филми от lyso PC и Curosurf имаме за цел да изследваме влиянието на лизолипида върху стабилността на филмите от Curosurf. Резултатите от изследването на стабилността на черните филми на смеси от Curosurf в присъствие на lyso PC ($C_c = 6 \mu\text{g/ml}$) при физиологична концентрация на NaCl – 0.15 mol.dm^{-3} са представени на фигури III-18a и III-18b. Измерени бяха и някои от равновесните дебелини на филмите в

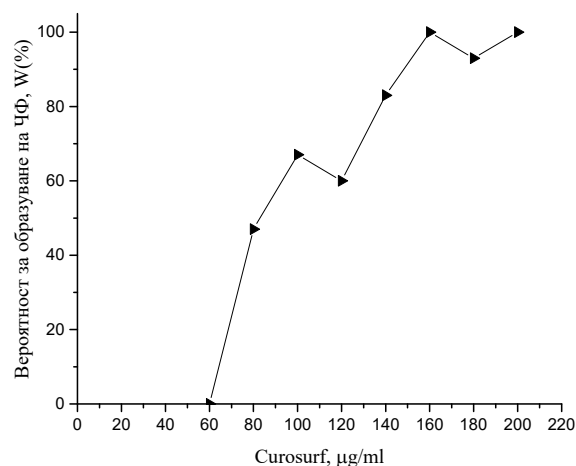
случаите, в които това беше практически възможно. Резултатите са обобщени в таблица 5.

Таблица 5: Измерени дебелини на равновесни черни филми при фиксирана концентрация на lyso PC и в присъствие на $0.15 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ NaCl}$

Curosurf [$\mu\text{g/ml}$] (lyso PC = $6 \mu\text{g/ml}$)	Равновесен черен филм [nm]
100	13.6 ± 1.28
120	13.4 ± 0.74
180	13.5 ± 0.49
200	14.2 ± 0.62



Фигура III-18a. Зависимост на вероятността за образуване на ЧФ на смесените филми от концентрацията на Curosurf (lyso PC = $6 \mu\text{g/ml}$) след 30 минути от зареждането на разтвора. Експериментите са проведени при $0.15 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ NaCl}$, $T = 22^\circ\text{C}$.

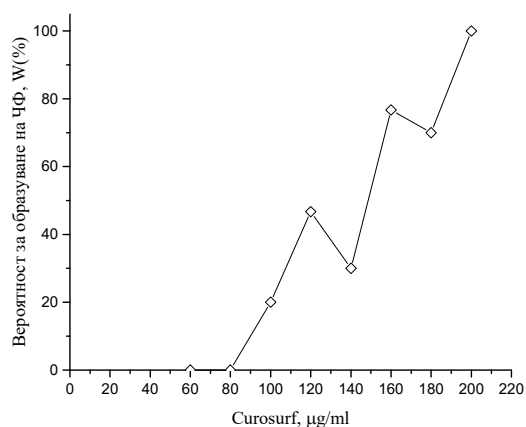


Фигура III-18b. Зависимост на вероятността за образуване на ЧФ на смесените филми от концентрацията на Curosurf (lyso PC = $6 \mu\text{g/ml}$) след 60 минути от зареждането на разтвора. Експериментите са проведени при $0.15 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ NaCl}$, $T = 22^\circ\text{C}$.

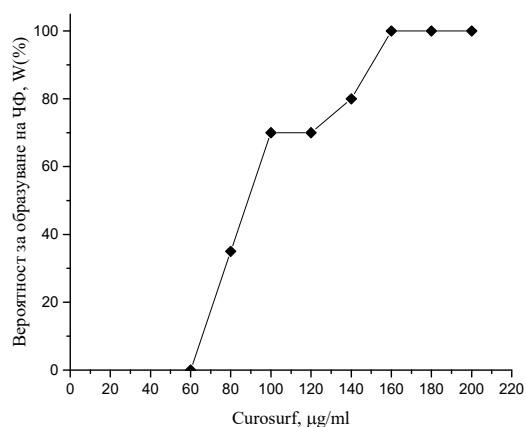
Измерените дебелини на смесените черни филми на практика съвпадат с дебелините, които получихме при филмите от чист Curosurf. Това означава, че лизолипидните молекули не оказват съществено влияние върху дебелината на филма. Налице е забележима промяна в стабилността на смесените филми в сравнение с тези от чистия терапевтичен препарат. Добре изразената стръмна крива на чистия Curosurf става по-полегата при смесения филми с lyso PC. Видно е, че процентите стабилни черни филми се отместват надясно и са по-ниски при смесените филми. Сравняването на стойностите

за C_t концентрацията показва, че тя отнема с $40 \mu\text{g/ml}$ нагоре при сместа lyso PC-Curosurf до $200 \mu\text{g/ml}$ след 30-ата минута и до $160 \mu\text{g/ml}$ след 60-ата минута.

Изхождайки от избора на подходяща концентрация на lyso PC при смесите с Curosurf в присъствие на NaCl като електролит, приложихме същия подход към смесването на Curosurf и лизолипида в присъствие на CaCl_2 , фиксирайки намерената по-рано C_c стойност при експериментите с lyso PC в среда с калциевия електролит.



Фигура III-19а. Зависимост на вероятността за образуване на ЧФ на смесените филми от концентрацията на Curosurf (lyso PC = $4 \mu\text{g/ml}$) след 30 минути от зареждането на разтвора. Експериментите са проведени при $0.1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$, $T = 22^\circ\text{C}$.



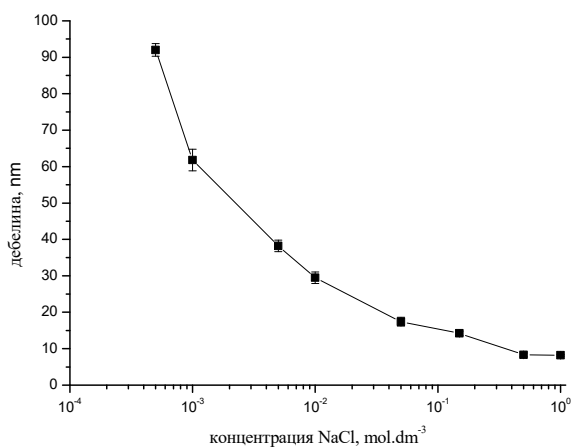
Фигура III-19б. Зависимост на вероятността за образуване на ЧФ на смесените филми от концентрацията на Curosurf (lyso PC = $4 \mu\text{g/ml}$) след 60 минути от зареждането на разтвора. Експериментите са проведени при $0.1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$, $T = 22^\circ\text{C}$.

Резултатите от изследването на вероятността за получаване на стабилни черни филми в присъствие на CaCl_2 при вариране на Curosurf и фиксирана концентрация на lyso PC = $4 \mu\text{g/ml}$ са показани на фигури III-19а и III-19б. Дебелините на смесените филми са близки до тези на чистия Curosurf и очевидно не се повлияват от повишаване на концентрацията на терапевтичния сурфактантен препарат. Подобно на предходния случай и тук смесените филми показват по-ниска стабилност с отнемване на концентрацията на C_t нагоре като ефектът е по-осезаем след 30-ата минута.

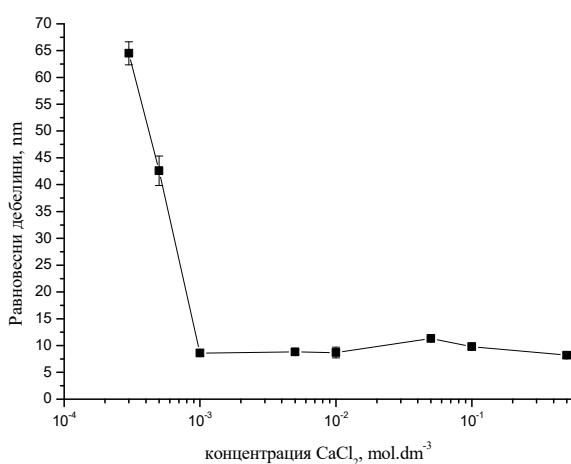
Проведохме изследване и на зависимостта на равновесната дебелина на смесените филми от концентрацията на електролит като това бе направено и за двата използвани електролита дотук – NaCl и CaCl_2 . При тези експерименти се спряхме на концентрации на смесените филми, съответстващи на C_t , установени по-рано в хода на изследването. Резултатите са показани на фигури III-20 и III-21, а на фигура III-22 е направено

сравняване на получените зависимости на базата на стойностите на специфичната електропроводимост на разтворите [mS/m].

И при използването на двата електролита е налице намаляване на дебелината на ТТФ с увеличаване на концентрацията на солта. При разтворите с NaCl това става плавно като от 92 nm при $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ филмите изтъняват до 8.2 nm при 1 mol.dm^{-3} . При ТТФ в присъствие на CaCl_2 изтъняването е много по-рязко. Най-дебелите измерени ТТФ бяха при $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3} \sim 65 \text{ nm}$, след което дебелината им намалява забележимо при $7 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ до $\sim 44 \text{ nm}$. При $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ вече се наблюдават много тънки черни филми $\sim 8.6 \text{ nm}$ и на практика по-нататъшното увеличение на концентрацията на CaCl_2 не води до ново изтъняване на филмите.



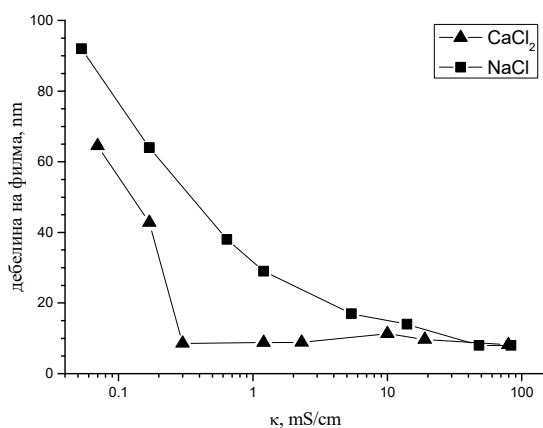
Фигура III-20. Зависимост на равновесната дебелина на филма от концентрацията на NaCl на смесените филми от lyso PC ($C_c = 6 \mu\text{g/ml}$) и Curosurf ($C_i = 200 \mu\text{g/ml}$). Експериментите са проведени при $T = 22^\circ\text{C}$.



Фигура III-21. Зависимост на равновесната дебелина на филма от концентрацията на CaCl_2 на смесените филми от lyso PC ($C_c = 4 \mu\text{g/ml}$) и Curosurf ($C_i = 200 \mu\text{g/ml}$). Експериментите са проведени при $T = 22^\circ\text{C}$.

Сравнението на получените резултати на база специфичната електропроводимост (κ) на фигура III-22 показва, че при една и съща стойност на електропроводимостта на двата електролита филмите имат различна дебелина при ниските концентрации на солите. На сравнителната графика е отчетлив падът на дебелината при разтворите с CaCl_2 още при

най-ниските стойности, което говори за силното влияние на Ca^{2+} йони върху структурата на филма.

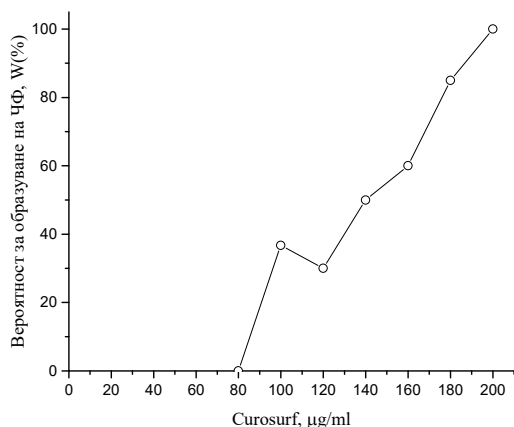


Фигура III-22. Сравнителна графика на зависимостта на равновесната дебелина на филмите от специфичната електропроводимост (κ) и вида на електролита на смесените филми от lysoPC (C_c) и Curosurf (C_t). Експериментите са проведени при $T = 22^\circ\text{C}$.

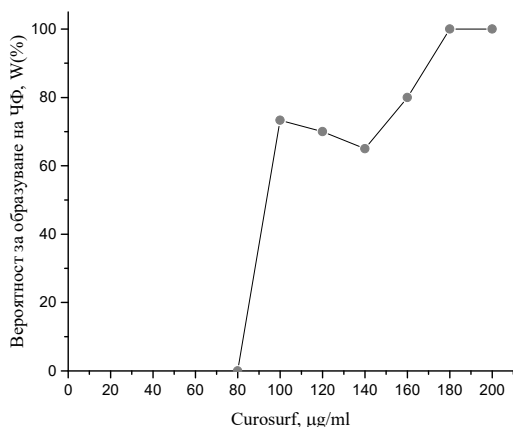
3.7. Смесени филми – lyso PG и Curosurf

Подходът при изучаването на смесените филми от lyso PG с Curosurf бе същият, както приложеният по-горе при смесването на терапевтичния сърфактант с lyso PC. Този път пристъпихме направо към смесване на различни концентрации Curosurf с получената по-рано стойност за C_c на лизолипода в присъствие на CaCl_2 - $4 \mu\text{g/ml}$. Чрез смесените филми от lyso PG и Curosurf имаме за цел изучаването на влиянието на заредения лизолипид върху стабилността на филмите от Curosurf.

Беше изследвана вероятността за образуване на черни филми (W) от концентрацията на Curosurf в присъствие на lyso PG при концентрация C_c при използването на два различни електролита – $0.15 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$ и $0.1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$. Резултатите от изследването с електролитна концентрация $0.15 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$ са показани на фигури III-22a и III-22b. И тук, както и при експериментите на смесените филми между lyso PC и Curosurf, се забелязва отчетливо влиянието на присъствието на ниски концентрации от лизолипода върху стабилността на черните филми. Налице е отместване на C_t концентрацията на Curosurf отново с $40 \mu\text{g/ml}$ към по-високите концентрации – съответно от $160 \mu\text{g/ml}$ при чистия препарат до $200 \mu\text{g/ml}$ в сместта след 30-ата минута и от $140 \mu\text{g/ml}$ към $180 \mu\text{g/ml}$ след 60-ата минута. Бяха получени и дебелини на смесените филми. Дебелините са почти съпоставими с тези на чистия препарат, което означава, че при тази електролитна концентрация не се открива съществено влияние на йоните, както и на лизолипода върху филмите с Curosurf.



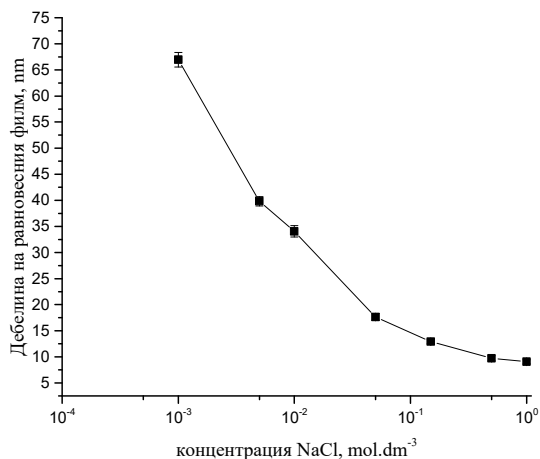
Фигура III-23а. Зависимост на вероятността за образуване на ЧФ от концентрацията на Curosurf в смесени филми с lyso PG (4 µg/ml) след 30 минути от зареждането на разтвора. Експериментите са проведени при $0.15 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ NaCl}$, $T = 22^\circ\text{C}$.



Фигура III-23б. Зависимост на вероятността за образуване на ЧФ от концентрацията на Curosurf в смесени филми с lyso PG (4 µg/ml) след 60 минути от зареждането на разтвора. Експериментите са проведени при $0.15 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ NaCl}$, $T = 22^\circ\text{C}$.

Когато започнахме изследване върху зависимостта на вероятността за образуване на стабилни черни филми от концентрацията на Curosurf в смесени филми с lyso PG в присъствие на CaCl_2 се оказа, че при C_c за lyso PG = 20 µg/ml смесите с Curosurf дават стабилни НЧФ. При измерване на смес от Curosurf с концентрация 80 µg/ml с lyso PG с концентрация = 12 µg/ml отново получихме стабилни НЧФ. Стана ясно, че няма практическа възможност за получаването на зависимостта такава, каквато бе намерена за Curosurf и lyso PC.

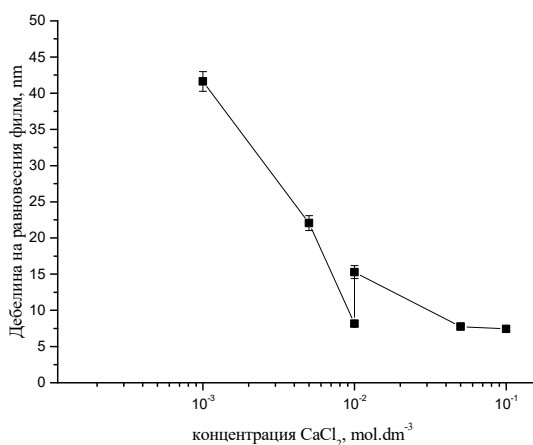
Беше извършено и изследване на зависимостта на дебелината на смесените филми от концентрацията на електролит. Резултатите са показани на фигури III-24 и III-25.



Фигура III-24. Равновесни дебелини (h , nm) на ТТФ от смеси на lyso PG с концентрация 4 µg/ml и Curosurf с концентрация 200 µg/ml като функция от концентрацията на NaCl, $T = 22^\circ\text{C}$

При измерванията с разтвори на NaCl е налице плавно намаление на дебелината на смесените филми с увеличаване на концентрацията на електролита. Най-голяма дебелина имат филмите при $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$ NaCl $\sim 65 \text{ nm}$. При $5 \cdot 10^{-1} \text{ mol.dm}^{-3}$ тя намалява до $\sim 9.7 \text{ nm}$ и на практика почти не се изменя при по-нататъшното покачване на електролитната концентрация.

Интересен ефект бе намерен при изследването на смесените разтвори на Iyso PG и Curosurf в CaCl₂. Изследваната смес бе с концентрации на двете вещества, съответстващи на намерените критични концентрации (C_c) при изследванията им поотделно разгледани по-рано в изложението. При ниските концентрации на електролит очаквано филмите са сиви с голяма дебелина $\sim 41 \text{ nm}$. При $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.dm}^{-3}$ CaCl₂ филмите изтъняват до обикновени черни с дебелина $\sim 15 \text{ nm}$, след което със скок преминават в нютонови черни, които са почти два пъти по-тънки: $\sim 8 \text{ nm}$. Този ефект на „прескачане“ от ОЧФ към НЧФ не се наблюдава при следващите по-високи концентрации на електролит, при които направихме измервания – съответно $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol.dm}^{-3}$, $1 \cdot 10^{-1} \text{ mol.dm}^{-3}$ и $5 \cdot 10^{-2} \text{ mol.dm}^{-3}$. Наблюдаваните при изброените концентрации на CaCl₂ ТТФ бяха нютонови черни с незначително намаляване на дебелината им – съответно 7.7 nm , 7.4 nm и 7.1 nm .

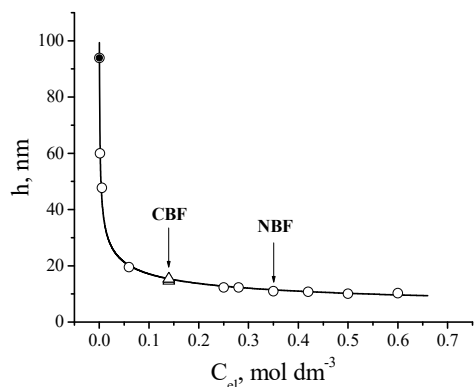


Фигура III-25. Равновесни дебелини (h, nm) на ТТФ от смеси на Iyso PG с концентрация 20 $\mu\text{g/ml}$ и Curosurf с концентрация 80 $\mu\text{g/ml}$ като функция от концентрацията на CaCl₂

3.8. Тънки течни филми от AS-B

Зависимостта на равновесната дебелина на пенни филми от AS-B от концентрацията на NaCl при 23 °C е показана на фигура III-26. При ниските електролитни концентрации се образуват сиви равновесни филми, чиято дебелина постепенно намалява с увеличаване на концентрацията на NaCl. При $0,06 \text{ mol.dm}^{-3}$ NaCl за първи път се наблюдава образуване на черни петна в дебелите $19,5 \text{ nm}$ филми. При $0,14 \text{ mol.dm}^{-3}$ NaCl се наблюдава за първи път образуването на ЧФ. По-нататъшното изтъняване на получените ТТФ с увеличаване на концентрацията на електролит показва, че те са тип ОЧФ. След

0,35 mol.dm⁻³ NaCl минималното изтъняване на дебелината на филмите дава основание те да бъдат разглеждани като НЧФ. При 0,6 mol.dm⁻³ NaCl дебелината е 10,3 nm. Намалението на дебелините на филмите при увеличаване на концентрацията на електролит до 0,06 mol.dm⁻³ NaCl показва, че при тези филми действат сили на електростатично отблъскване. Заслужава да се отбележи регистрирания плавен преход към НЧФ, който може да се тълкува като признак за действие на допълнителна положителна компонента на разклинящо налягане.



Фигура III-26. Зависимост на равновесната дебелина на пенни филми от AS-B от концентрацията на NaCl при 23 °C

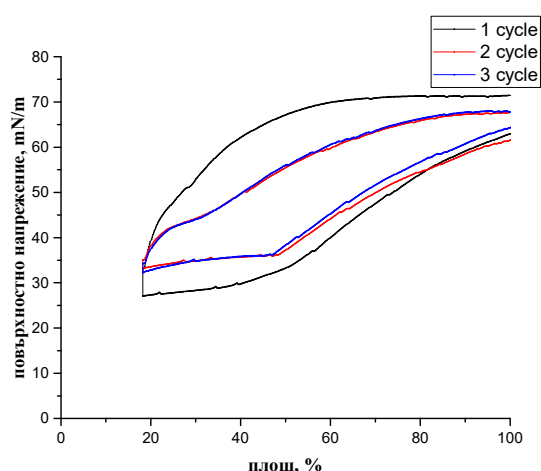
4. Монослоеве от лизолипиди и терапевтични сърфактантни препарати, изследвани чрез везната на Langmuir

4.1. Монослоеве от lyso PC

Адсорбцията на различни концентрации от lyso PC е проследена във времето. На фигура IV-1 е показана промяната на повърхностното напрежение (σ) при адсорбция на две различни концентрации от lyso PC върху подложка от 0.15 mol.dm⁻³ NaCl. Концентрациите са подбрани на база резултатите от измерванията с тънки течни филми – 6 $\mu\text{g/ml}$ (съответстваща на C_c) и 12 $\mu\text{g/ml}$ (над C_l). Зависимостта при адсорбцията и при двете концентрации е сходна като намалението на повърхностното напрежение е стръмно до 5-ата минута, след което почти не се изменя и се установява на стойност около 40 mN/m. При същия експеримент, но с концентрация на lyso PC значително под C_c (2 $\mu\text{g/ml}$), спадането на повърхностното напрежение е с много по-малка стойност. Спрямо първоначалната стойност намалението му е едва с ~ 10 mN/m спрямо началното като достига до около 61 mN/m в края на измерването.

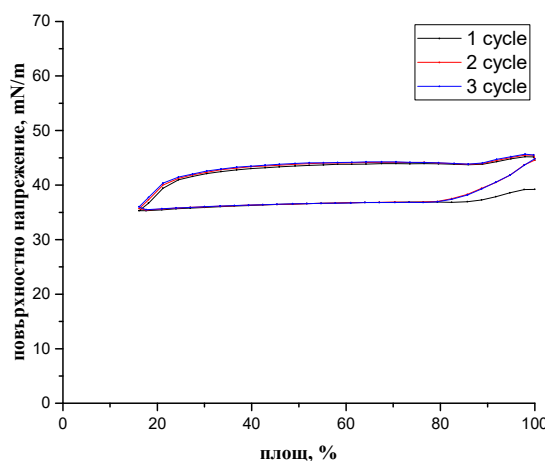
Освен с 0.15 mol.dm⁻³ NaCl беше измерена адсорбцията на lyso PC и върху подложка от 0.1 mol.dm⁻³ CaCl₂. Концентрациите на лизолипида отново са същите, използвани и при експериментите с физиологичната концентрация на NaCl. Понижението на повърхностното напрежение е сходно с това при предходните експерименти. Беше изучено и поведението на лизолипида при компресия с намаляване на първоначалната

площ на ваната до 20%. Съответно бяха получени стойности за σ_{\max} и σ_{\min} . На фигура IV-5 са показани три цикъла на компресия на lyso PC с концентрация 2 $\mu\text{g/ml}$ върху подложка от 0.15 mol.dm^{-3} NaCl. Прави впечатление, че промяната на повърхностното напрежение е сходна при втория и третия цикъл, докато при първи цикъл σ_{\min} е с по-ниска стойност при максимална компресия спрямо тях, а при декомпресия стойността на σ расте по-стръмно.



Фигура IV-5. Компресия/декомпресия на монослое от lyso PC (2 $\mu\text{g/ml}$) в 0.15 mol.dm^{-3} NaCl ($T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$). Експериментът е проведен с Kibron Microtrough -X (Kibron, Inc., Helsinki, Finland).

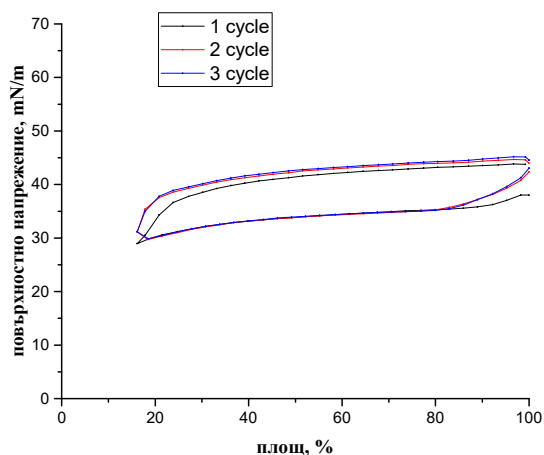
При шест пъти по-висока концентрация на lyso PC – 12 $\mu\text{g/ml}$, не се наблюдава такава разлика между първия и останалите цикли по време на компресия/декомпресия. Резултатите са показани на фигура 4-6. При тези измервания не бе отчетено и осезаемо нарастване на σ при декомпресия.



Фигура IV-6. Компресия/декомпресия на монослое от lyso PC (12 $\mu\text{g/ml}$) в 0.15 mol.dm^{-3} NaCl ($T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$). Измерването е проведено на KSV NIMA Langmuir Trough.

Бяха проведени и измервания при компресия/декомпресия на lyso PC с 0.1 mol.dm^{-3} CaCl_2 , които са показани на фигура IV-7. Тук може да бъде отчетена разлика при σ_{\min} спрямо резултатите при експеримента с 0.15 mol.dm^{-3} NaCl. Както се вижда от

сравняването на фигури IV-6 и IV-7 σ_{\min} при електролит CaCl_2 достига до стойности до малко под 30 mN/m, докато при 0.15 mol.dm^{-3} NaCl най-ниската стойност е $\sim 35 \text{ mN/m}$.

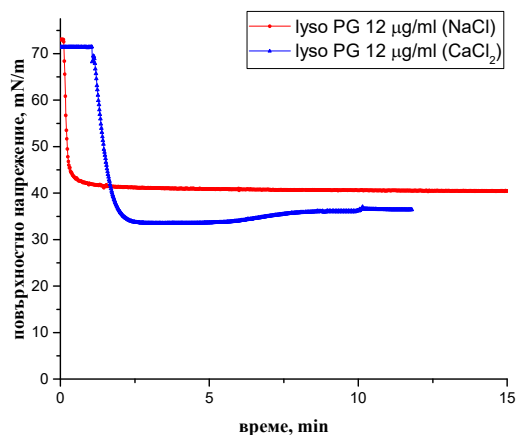


Фигура IV-7. Компресия/декомпресия на монослоеве от lyso PC ($12 \mu\text{g/ml}$) в 0.1 mol.dm^{-3} CaCl_2 ($T = 22^\circ\text{C}$). Измерването е проведено на KSV NIMA Langmuir Trough.

4.2. Монослоеве от lyso PG

Експериментите с lyso PG, както и при тези с lyso PC, отново бяха фокусирани върху измерване на времето на разтичане и промяната на повърхностното напрежение (σ) като отново бяха използвани два електролита – NaCl и CaCl_2 . Подбраните концентрации при работа с 0.15 mol.dm^{-3} NaCl съответстват на C_c и C_t от получените резултати с ТТФ.

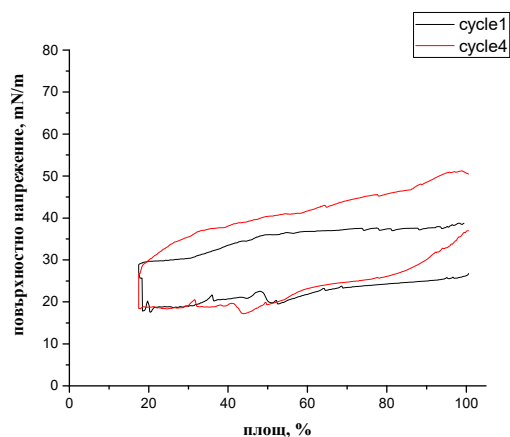
Увеличаването на концентрацията на lyso PG води до по-ниска стойност на σ – падът от $\sim 73 \text{ mN/m}$ при началото на измерването е до $\sim 42 \text{ mN/m}$ при $4 \mu\text{g/ml}$ lyso PG и $\sim 40 \text{ mN/m}$ при $12 \mu\text{g/ml}$. На фигура IV-9 са сравнени данните за адсорбцията на lyso PG при една и съща концентрация на лизолипида и различен електролит. Намалението на стойността на σ е по-голямо, когато електролитът е CaCl_2 . ($\sim 36 \text{ mN/m}$). Обяснение за този резултат може да се търси във взаимодействие на двувалентните калциеви йони и заряда на молекулата на lyso PG.



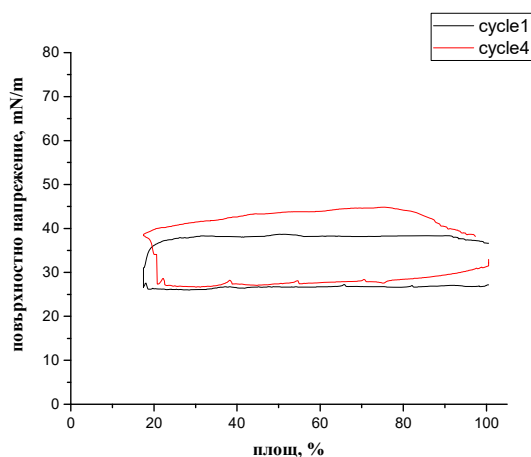
Фигура IV-9. Адсорбция на монослоеве от lyso PG ($12 \mu\text{g/ml}$) върху подложки от 0.15 mol.dm^{-3} NaCl и 0.1 mol.dm^{-3} CaCl_2 ($T = 22^\circ\text{C}$). Измерването е проведено на KSV NIMA Langmuir Trough.

4.3. Монослоеве от Infasurf

Изследването на изменението на повърхностното напрежение на чист Infasurf при две различни концентрации ($37 \mu\text{g/ml}$ и $75 \mu\text{g/ml}$) на въздушно-водната фазова граница върху подложка от $0,15 \text{ mol.dm}^{-3}$ NaCl показва, че то намалява с времето, достигайки до стойности под 30 mN/m . Изследвана бе зависимостта на минималното повърхностно напрежение (σ_{min}) при компресия/декомпресия на монослоеве от чист Infasurf. Използвани са същите две концентрации на терапевтичния препарат. На фигури IV-13 и IV-14 са показани първи и четвърти цикъл на компресия при две различни концентрации на Infasurf на въздушно-водната фазова граница. Вижда се, че при по-ниската концентрация компресията води до пад на стойността на σ_{min} под 20 mN/m , докато при два пъти по-високата концентрация стойността е над 25 mN/m . При декомпресията се наблюдава покачване на повърхностното напрежение като стойността му остава около 40 mN/m и за двете концентрации Infasurf.



Фигура IV-13. Цикли на компресия/декомпресия на Infasurf ($37 \mu\text{g/ml}$) върху субфаза от 0.15 mol.dm^{-3} NaCl при $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$. Експериментът е проведен с Kibron Microtrough -X (Kibron, Inc., Helsinki, Finland).



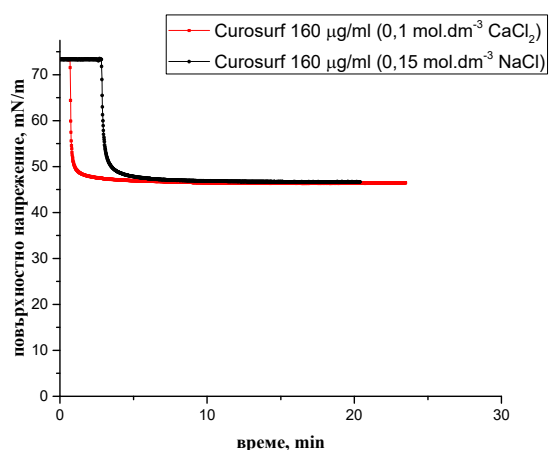
Фигура IV-14. Цикли на компресия/декомпресия на Infasurf ($75 \mu\text{g/ml}$) върху субфаза от 0.15 mol.dm^{-3} NaCl при $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$. Експериментът е проведен с Kibron Microtrough -X (Kibron, Inc., Helsinki, Finland).

4.4. Монослоеве от Curosurf

Измерванията с Curosurf бяха проведени при използването на две различни подложки – от 0.15 mol.dm^{-3} NaCl и 0.1 mol.dm^{-3} CaCl₂. Резултатите за разтичането на въздушно-водната фазова граница са показани на фигура IV-15. Видно е, че и за двата електролита при една и съща концентрация на терапевтичния сърфактантен препарат ($160 \mu\text{g/ml}$) стойността на σ спада до около 45 mN/m почти веднага след нанасянето и не се изменя с времето. Тази стойност е близка до докладваната от Лалчев и Христова [35], но тук

следва да се уточни разликата в условията (температурата) и концентрацията на сърфактанта. Концентрацията на Curosurf е подбрана на база на изследванията с тънки течни филми в нашите експерименти и отговаря на получената стойност за C_t .

Сравняването на резултатите при разтичане за Curosurf с тези за Infasurf е трудно поради използваните различни концентрации за двата препарата. Все пак, от гледна точка на това, че и в двата случая концентрациите отговарят на C_t може да се направи заключение, че при Infasurf стойността на повърхностното напрежение пада повече от Curosurf при еднакви условията на експеримента (температура, субфаза).

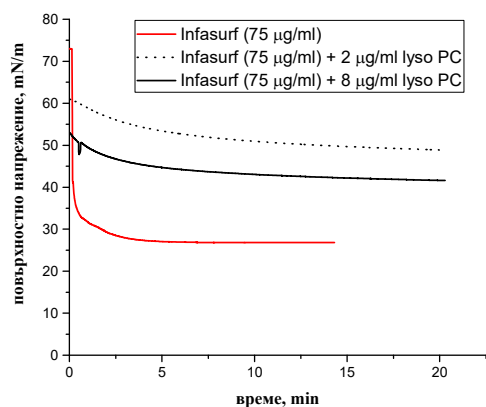


Фигура IV-15. Адсорбция на монослоеве с Curosurf върху подложка от 0.15 mol.dm⁻³ NaCl и 0.1 mol.dm⁻³ CaCl₂ ($T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$). Измерването е проведено на KSV NIMA Langmuir Trough.

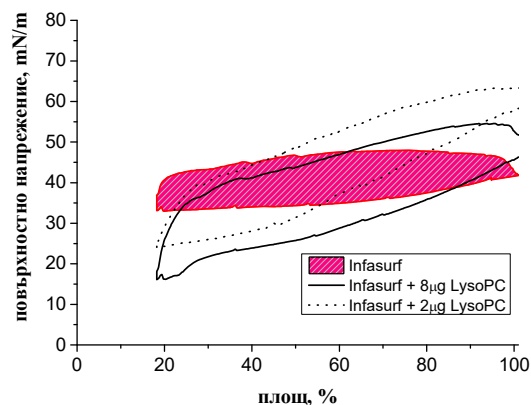
Резултатите при компресия/декомпресия на монослоеве с Curosurf при използването на субфаза от двата електролита са показват, че стойността на повърхностното напрежение пада повече при използването на подложка от CaCl₂. Това се отнася както за първи, така и за втори цикъл.

4.5. Смесени монослоеве – Infasurf с lyso PC

Сравнението на резултатите за Infasurf с тези на негови смеси с lyso PC (фигура IV-18) разкрива влиянието на лизолипида върху образуването на монослоя. Установено бе, че ниски концентрации на lyso PC (2 µg/ml) инхибират адсорбцията на терапевтичния сърфактантен препарат. Подобно поведение бе установено и с помощта на техниката на тънкия течен филм. Когато към Infasurf се добавят 8 µg/ml lyso PC ефектът е по-слабо изразен. Тези резултати подкрепят тезата за образуването на смесен монослой между компонентите на Infasurf и лизолипида.



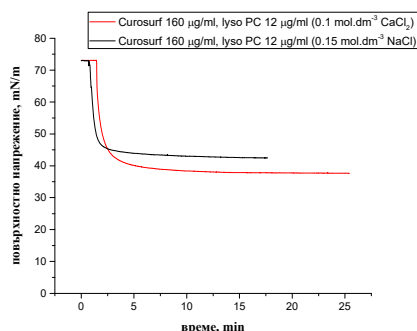
Фигура IV-18. Повърхностното напрежение (σ) като функция от времето за адсорбция на Infasurf (75 $\mu\text{g/ml}$) и на негови смеси с lyso PC. Експериментът е проведен в присъствие на $0.15 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ NaCl}$, $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$ с помощта на Kibron Microtrough -X (Kibron, Inc., Helsinki, Finland).



Фигура IV-19. Изотерми на изменението повърхностно налягане – площ на адсорбирани монослоеове от Infasurf (75 $\mu\text{g/ml}$) и негови смеси с lyso PC. Представените криви са трети цикъл при компресия/декомпресия между 100% и 20% от началната площ. Експериментите са извършени в присъствие на $0.15 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ NaCl}$, $T=22^\circ\text{C}$. Експериментът е проведен с Kibron Microtrough -X (Kibron, Inc., Helsinki, Finland).

4.6. Смесени монослоеове – Curosurf с lyso PC

Изследванията на смесени монослоеове от Curosurf и lyso PC по подобие на монослоевете с Infasurf бяха проведени върху подложка от NaCl. Допълнително беше изучено влиянието и на CaCl_2 като електролит. Смесването с lyso PC бе съгласно получените резултати от изследванията с ТТФ за C_s и C_t концентрациите на лизолипида. При проследяване на времето за разтичане при адсорбционните слоеве при използването на физиологична концентрация на NaCl кривите са почти идентични като след 5-ата минута стойността на повърхностното напрежение спира да се изменя, установявайки се на стойност $\sim 40 \text{ mN/m}$. При замяната на електролита с $0.1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$ намалението на стойността на повърхностното напрежение, което се наблюдава с времето, води до понижение на σ под 40 mN/m . Направихме и сравнение на респрединга на смес от Curosurf и lyso PC при двата електролита, показани на фигура IV-22. Присъствието на калциевите йони влияе върху стойността на σ като тя намалява по-силно в сравнение с измерените от нас стойности при използването на NaCl.

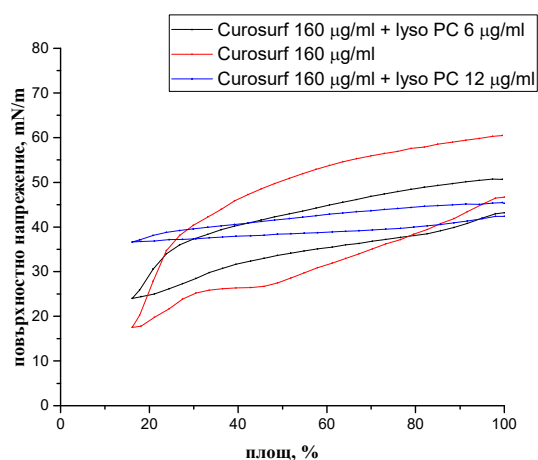


Фигура IV-22. Адсорбция на монослоеве от Curosurf с lyso PC (12 µg/ml) върху подложка от 0.15 mol.dm⁻³ NaCl и 0.1 mol.dm⁻³ CaCl₂. Измерването е проведено на KSV NIMA Langmuir Trough.

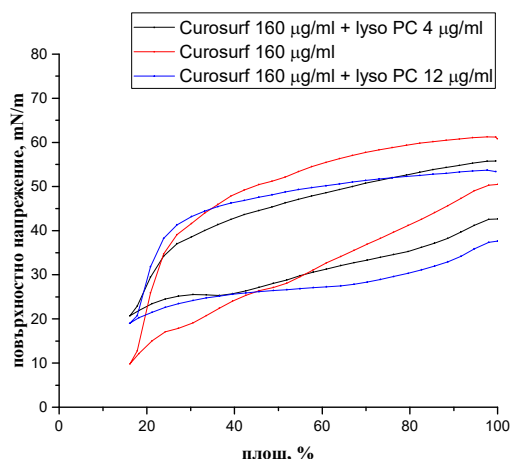
Изследването върху изменението на повърхностното налягане при компресия/декомпресия на смесите от lyso PC и Curosurf проведохме отново, взимайки предвид намерените стойности за C_c и C_t за лизолипида. На фигура IV-23 и IV-24 са показани изотермите при първи цикъл на компресия на чист Curosurf и lyso PC при използването на двете електролитни концентрации на NaCl и CaCl₂.

Един от основните изводи от получените резултати от графиките е, че намалението на стойността на σ е по-силно изразено при използването на CaCl₂. Ефектът на C_c концентрацията на lyso PC върху поведението на сместта при компресия е по-силно изразен при подложката от NaCl. При смесите, в които терапевтичният сурфактантен препарат е смесен с лизолипида с концентрация C_t хистерезисът на кривата се различава съществено от случая, в който използвахме lyso PC с неговата C_c концентрация.

При използването на 0.1 mol.dm⁻³ CaCl₂ получените резултати при компресия/декомпресия показват, че присъствието на lyso PC повлиява като цяло изменението на стойностите на σ , но промяната в концентрацията на лизолипида не води до драматична промяна в профила на кривите.



Фигура IV-23. Първи цикъл на компресия на монослоеве от Curosurf и lyso PC върху подложка от 0.15 mol.dm⁻³ NaCl. Измерването е проведено на KSV NIMA Langmuir Trough.



Фигура IV-24. Първи цикъл на компресия на монослоевете от Curosurf и lyso PC върху подложка от $0.1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$. Измерването е проведено на KSV NIMA Langmuir Trough.

4.7. Смесени монослоевете – Curosurf с lyso PG

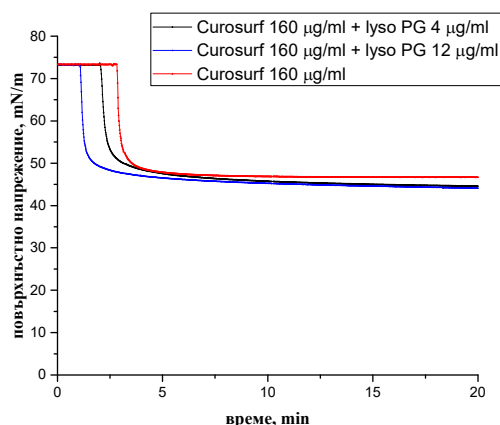
Смесените адсорбционни монослоевете между Curosurf и заредения лизолипид lyso PG бяха изследвани в присъствие на физиологична концентрация на NaCl, както и при използване на $0.1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$. С оглед на интересните резултати при експериментите с ТТФ нашите очаквания бяха за различно поведение на монослоевите в присъствие на двувалентните калциеви йони. При работата с NaCl приложихме пропорции на смесване, при които ТСП бе с получената от нас C_t концентрацията при изследванията с ТТФ, а лизолипидът бе с получените стойности за C_c и C_t , намерени от вероятностните криви. При работата с CaCl_2 поради невъзможността за намиране на C_c и C_t на лизолипида в смесите в експериментите ни с пенните филми, прибегнахме до добавянето на лизолипидна концентрация към Curosurf за адсорбционните измервания, която е под C_c стойността, намерена при експериментите с чистия lysoPG.

Адсорбцията на смесените монослоевете с подложка от $0.1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ NaCl}$ е показана на фигура IV-25. Намалението на стойността на повърхностното напрежение с времето е по-осезаемо до 5-ата минута, след което то почти не се изменя. Получените стойности за σ показват, че концентрацията на lyso PG на практика не повлиява разтичането на монослоя.

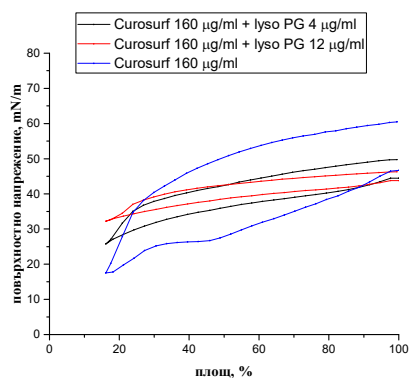
При използването на подложката от $0.1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$ смесването на Curosurf със заредения лизолипид води до отчетливо понижение в стойността на повърхностното напрежение с времето. Тази стойност е сравнително близка до получената при адсорбцията на сместа на Curosurf с lyso PC.

Хистерезисните криви при компресия/декомпресия, показани на фигури IV-27 и IV-28 очертават тенденция към по-слабо изразено намаление на повърхностното напрежение с

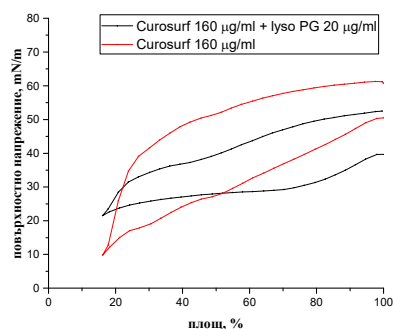
повишаване на концентрацията на лизолипида (фигура IV-27) и същевременно по-силно намаление на σ_{\min} при подложката от CaCl_2 в сравнение с тази от NaCl .



Фигура IV-25. Адсорбция на монослое от Curosurf и lyso PG върху подложка от $0.15 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ NaCl}$. Измерването е проведено на KSV NIMA Langmuir Trough.



Фигура IV-27. Първи цикъл на компресия на монослое от Curosurf и lyso PG върху подложка от $0.15 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ NaCl}$ ($T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$). Измерването е проведено на KSV NIMA Langmuir Trough.



Фигура IV-28. Първи цикъл на компресия на монослое от Curosurf и lyso PG върху подложка от $0.1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$ ($T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$). Измерването е проведено на KSV NIMA Langmuir Trough.

7. Основни резултати и изводи

- Намерени са $W(C)$ зависимостите за lyso PC, lyso PG, Curosurf в $0.15 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ NaCl}$ и $0.1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$. Определени са C_c и C_l за изброените съфактанти при двете използвани електролитни концентрации на NaCl и CaCl_2 . Измерени са равновесните дебелини на ТТФ като някои от получените резултати имат потвърдителен, а други – оригинален характер.
- Изследвана е зависимостта на дебелината на ТТФ, стабилизирани от NaCl и CaCl_2 , от концентрацията на lyso PG. Експериментите в присъствие на Ca^{2+} показаха много силно взаимодействие на тези йони с полярната група на липидните молекули, което като резултат се изразява в образуване на НЧФ при по-висока концентрация на електролит.
- В присъствие на физиологична концентрация на NaCl (0.15 mol.dm^{-3}) е изследвано влиянието на незаредения lyso PC върху стабилността на ТТФ от Infasurf и Curosurf. Показано е, че ниски концентрации от лизолипида имат дестабилизиращо действие върху образуването на черни филми от терапевтичните съфактантни препарати.

4. Изследвано е влиянието на незаредения lyso PC върху стабилността на ТТФ от Curosurf в присъствие на $0.1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$ и е показано, че ниски концентрации на лизолипида водят до дестабилизиране на филмите от Curosurf – още един резултат в подкрепа на инхибиращия ефект на лизолипидите върху ТСП при взаимодействието им.

5. Намерена е зависимостта на дебелината на ТТФ от Curosurf (с концентрация C_1) при наличие на lyso PC (концентрация C_c) в присъствие на NaCl и CaCl_2 . Показано е, че ТТФ в среда от CaCl_2 са с по-малка дебелина, което вероятно се дължи на влиянието на двувалентните калциеви йони върху взаимодействието във филма.

6. Изследвана е зависимостта на ТТФ от AS-B с промяната на концентрацията на електролит. Стръмното намаляване на дебелината на обикновените ТТФ от AS-B с увеличаване на C_{el} свидетелства за наличието на далекодействащи електростатични повърхностни сили, стабилизиращи ТТФ.

7. Изследвано е влиянието на заредения lyso PG върху стабилността на ТТФ от Curosurf в присъствие на $0.15 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ NaCl}$ и е показано, че ниски концентрации на лизолипида водят до дестабилизиране на филмите от Curosurf. Не е намерена такава зависимост при използване на $0.1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$.

8. Изследвано е времето за адсорбция на монослоевете от lyso PC, lyso PG, Infasurf и Curosurf във физиологична концентрация на NaCl. Времето за разтичане и промяната в повърхностното напрежение на двата лизолипида и Curosurf бяха изследвани и в среда от $0.1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$. Показано е, че падът на повърхностното напрежение е по-голям при наличие на двувалентните калциеви йони.

9. Получени са хистерезисните криви при компресия/декомпресия на монослоя (с намаление на площта до 20% спрямо първоначалната площ) на смесени монослоевете между ТСП (Curosurf и Infasurf) и lyso PC в $0.15 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ NaCl}$. Показано е, че присъствието на лизолипида в сместа води до промени в стойността на повърхностното напрежение при компресия – инхибиращ ефект.

10. Намерени са хистерезисните криви при компресия/декомпресия на монослоя (с намаление на площта до 20% спрямо първоначалната площ) на смесени монослоевете между Curosurf и лизолипида (lyso PC и lyso PG) в среда от $0.1 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$. Показано е, че присъствието на лизолипидите влияе върху намалението на стойността на повърхностното напрежение при компресия, оказвайки инхибиращо действие.

8. Приноси в дисертацията

1. Проведените изследвания на поведението на ТТФ от lyso PG в присъствие на CaCl_2 , разкриват, че при високи концентрации на електролита наблюдаваните ТТФ от lyso PG са тип НЧФ. Преходът от сив филм към НЧФ се извършва скокообразно. Нашият експеримент потвърждава ролята на Ca^{2+} върху природата на бислойната повърхност.

Равновесната дебелина в тези много тънки филми зависи от близкодействащи не-DLVO сили между монослоеве от lyso PG.

2. Доказано е влиянието на lyso PC върху повърхностната активност на Infasurf – както чрез метода на тънкия течен филм, така и чрез изследване на монослой, съдържащ двата сурфактанта. Ниските концентрации на лизолипида в смес с Infasurf водят до дестабилизиране на образуването на ТТФ, както и до повишаване на стойността на повърхностното напрежение при компресия/декомпресия на монослоя. Резултатите показват приложимостта на модела на ТТФ за изследване на инхибиращия ефект на лизофосфолипидите върху АС, както и ролята на лизофосфолипидите за физиологичната активност на терапевтичните сурфактантни препарати при промяна в състава им.

3. Установено е влиянието на lyso PC и при смесването му с Curosurf чрез метода на ТТФ и изследванията на монослой. Намерено е дестабилизиране на образуването на черни филми от Curosurf в присъствието на ниски концентрации (C_c) на lyso PC – както при използване на NaCl, така и при смяна на електролита с CaCl₂. Изследванията с везната на Лангмюир на сместа показват по-малък пад в стойността на повърхностното напрежение при компресия/декомпресия на смесения монослой спрямо чистия ТСП.

4. Установено е влиянието на lyso PG при смесването му с Curosurf. чрез метода на ТТФ и чрез изследванията на монослой като е показано дестабилизиране на образуването на черни филми от Curosurf в присъствието на ниски концентрации (C_c) на lyso PG при физиологична концентрация на NaCl (0.15 mol.dm^{-3}), но не и при смяна на електролита с 0.1 mol.dm^{-3} CaCl₂. Изследванията с везната на Лангмюир на сместа показват по-малък пад в стойността на повърхностното напрежение при компресия/декомпресия на смесения монослой спрямо чистия Curosurf.

5. Установен е ефект и на скокообразно изтъняване на смесените ТТФ от lyso PG и Curosurf. При концентрация $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.dm}^{-3}$ CaCl₂ филмите изтъняват до ОЧФ, след което със скок преминават в НЧФ с два пъти по-малка дебелина. В сравнение с филмите от чист lyso PG, при същата електролитна концентрация, по-малката дебелина на смесените филми, съдържащи ТСП и начинът на изтъняване подчертава съществената роля на Ca²⁺ за природата на ТТФ при взаимодействието между лизолипида и ТСП.

Приложения

Приложение 1

Списък на публикациите на научните резултати, включени в дисертационния труд:

В списания с импакт фактор

1. R. Cohen, R. Todorov, **Sv. Alexandrov**, Y. Christova, Z. Lalchev, D. Exerowa, Direct measurement of molecular interaction forces in foam films from lung surfactant fraction, Coll Pol Sci, Vol. 284, Num. 5, pp. 546-550, 2006; IF: 1.906, Q2
2. **S. Alexandrov**, R. Todorov, A. Jordanova, Z. Lalchev, D. Exerowa, Inactivation of Pulmonary Surfactant by Lysophosphatidylcholine, Biotechnol. & Biotechnol. Eq., Vol. 23, Special Edition/On-line: pp 684-687, 2009; IF: 1.097, Q3
3. **S. Alexandrov**, R. Todorov, A. Jordanova, Z. Lalchev, D. Exerowa, Foam films stabilized with lysophosphatidylglycerol in the presence of Na⁺ and Ca²⁺, Bulgarian Chemical Communications, Volume 48, Special Issue A, pp. 18 – 22, 2016; IF: 0.242, Q4

В сборници от конференции

4. **С. Александров**, Р. Тодоров, З. Лалчев, Д. Ексерова (2016) Инактивация на терапевтични алвеоларни сурфактанти от лизофосфатидилхолин. In: Proceedings of the 3rd Bulgarian National Congress on Physical Sciences, Sofia, Bulgaria, Sep. 29 - Oct. 02, 2016, S08.22:1-6 [DVD: ISBN 978-954-580-364-2] Heron Press: Sofia
5. **S. Alexandrov**, R. Todorov, D. Exerowa, (2016), The Role of Ca²⁺ on Stability of Foam Films from Lysophosphatidylcholine and Curosurf, In Proceedings of 12-th National Medical Physics and Biomedical Engineering Conference-NMPEC, Nov 3 – Nov 5, 2016, Sofia, Bulgaria, pp 213-220, ISBN 978-954-915-894-6

Приложение 2

Експерименталните резултати, включени в дисертационния труд са докладвани на следните научни форуми:

Устни доклади:

1. Р. Коен, Р. Тодоров, **Св. Александров**, Д. Ексерова, Директно измерване на повърхностни сили в пенни филми от алвеоларен сурфактант, Национална научна сесия по химия за студенти и докторанти, 18-20 май 2005 г., Химически факултет на СУ „Св. Климент Охридски“, София, България.
2. **С. Александров**, Р. Тодоров, А. Йорданова, З. Лалчев, Д. Ексерова, Свойства на тънки течни филми от лизолипиди, IV научен семинар по физикохимия за млади учени и докторанти, 15- 17 април 2015 г., Институт по физикохимия, София, България

Постерни доклади:

1. **S. Alexandrov**, R. Todorov, Z. Lalchev, D. Exerowa, Inactivation of pulmonary surfactant by lysophosphatidylcholine, XI Anniversary Scientific Conference with International Attendance, 120 years of academic education in biology 45 years faculty of biology, “Biology – traditions and challenges”, May 27 – 29, 2009, Faculty of Biology, Sofia University “St. Kliment Ohridski”, Sofia, Bulgaria
2. **С. Александров**, Р. Тодоров, З. Лалчев, Д. Ексерова, Инактивация на терапевтични алвеоларни сурфактанти от лизофосфатидилхолин. III национален конгрес по физически науки, 29 септември – 3 октомври 2016 г., Интер Експо Център, София, България
3. **S. Alexandrov**, R. Todorov, D. Exerowa, The Role of Ca²⁺ on Stability of Foam Films from Lysophosphatidylcholine and Curosurf, 12-th National Medical Physics and Biomedical Engineering Conference-NMPEC, Nov 3 – 5, 2016; Sofia, Inter Expo Center, Bulgaria

Често използвани означения и съкращения в дисертацията

AS-B – хидрофобна фракция на алвеоларния сърфактант

DLVO – теория на Дерягин, Ландау, Фервей и Овербек

DPPC – дипалмитоилфосфатидилхолин

DPPG – дипалмитоилфосфатидилглицерол

lyso PC – лизофосфатидилхолин

lyso PG – лизофосфатидилглицерол

LB – осмиофилни ламеларни телца

AC – алвеоларен сърфактант

ТСП – терапевтичен сърфактантен препарат

РДС – респираторен дистрес синдром

ТТФ – тънък течен филм

ЧФ – черен филм

ОЧФ – обикновен черен филм

НЧФ – нютонов черен филм