

Aus der Klinik für Anaesthesiologie und operative Intensivmedizin, Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. K. Falke, Virchow-Klinikum, Medizinische Einrichtungen der Humboldt-Universität zu Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin.

**Aufbau und Einsatz eines Captive-Bubble-Surfactometers
zur Untersuchung der Oberflächeneigenschaften
pulmonalen Surfactants und anderer oberflächenaktiver Stoffe**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
am Virchow-Klinikum, Medizinische Fakultät der
Humboldt-Universität zu Berlin

vorgelegt von Ralf Herold
aus Essen

Referent: PD Dr. Ulrich Pison, Klinik für Anaesthesiologie und operative Intensivmedizin, Virchow-Klinikum, Medizinische Einrichtungen der Humboldt-Universität zu Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin

Koreferent: Prof. Dr. K. P. Hofmann, Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Humboldt-Universität zu Berlin, Ziegelstr. 5-9, 10117 Berlin.

Gedruckt mit Genehmigung des Virchow-Klinikums,
Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

Promoviert am 4. April 1997

1 Einleitung	1
2 Geschichte der Oberflächenforschung	2
3 Oberflächeneigenschaften und Meßmethoden	5
3.1 Oberflächenspannung	5
3.2 Oberflächenaktivität	6
3.3 Gekrümmte Oberflächen	7
3.4 Weitere Kenngrößen von Oberflächen	9
3.5 Herkömmliche Meßmethoden für die Oberflächenspannung	11
3.6 Das Captive-Bubble-Surfactometer als eine neue Meßmethode für die Oberflächenspannung	13
4 Bestandteile, biophysikalische Wirkungsweisen und Eigenschaften des pulmonalen Surfactants	16
4.1 Bestandteile des pulmonalen Surfactants	16
4.2 Biophysikalische Wirkungsweise von Surfactant in Alveolen	20
4.3 Biophysikalische Eigenschaften pulmonalen Surfactants und seine Funktionen in der Lunge	21
4.4 Veränderungen des endogenen Surfactants und Wirkungsweise exogenen Surfactants	24
4.5 Stand der Forschung in Hinblick auf die Messung biophysikalischer Eigenschaften mit dem Captive-Bubble-Surfactometer	26
5 Ziele dieser Untersuchung	28
6 Aufbau des Captive-Bubble-Surfactometers	30
6.1 Konzeption	30
6.2 Konstruktion	32
7 Materialien und Methoden	38
7.1 Lösungen und Substanzen	38
7.2 Datenverarbeitung	39
7.3 Tiermodell der Lungenschädigung	40
7.4 Chemische Bestimmungen	41
7.5 Phospholipidspektrum-Analyse	41
7.6 Reinigung von Geräten	42

II

7.7 Vorbereitung von Proben	42
7.8 Messungen der Oberflächenaktivität	43
7.9 Versuchsprotokolle	44
7.10 Eichung	45
7.11 Vermessung der Luftblase	47
7.12 Berechnungen	47
7.13 Auswertung	50
8 Ergebnisse	53
8.1 Überprüfung der experimentellen Rahmenbedingungen	53
8.2 Messung löslichen Surfactants	56
8.3 Messung unlöslicher Surfactants	59
8.4 Lungenschädigung und natürlicher Surfactant	71
9 Diskussion	79
9.1 Experimentelle Rahmenbedingungen	80
9.2 Messung löslichen Surfactants	84
9.3 Messung unlöslicher Surfactants	87
9.4 Natürlicher Surfactant bei Silica-induzierter Lungenschädigung	99
9.5 Abschließende Beurteilung der Versuche	103
10 Zusammenfassung und Ausblick	108
11 Referenzen	109
12 Abbildungsverzeichnis	116
13 Tabellenverzeichnis	117
14 Abkürzungen	118
15 Danksagung	119
16 Lebenslauf	120

1 Einleitung

In dieser Arbeit wird die Oberflächenaktivität verschiedener biologisch relevanter Substanzen in Hinsicht auf ihre biophysikalische Wirkung in der Lunge mit einem neuen Untersuchungsverfahren quantifiziert.

Die gasaustauschende Funktion der Lunge ist an die Intaktheit der Luft-Gewebe-Grenze gebunden. Eine möglichst große innere Oberfläche muß ständig verfügbar sein und zusätzlich in einem optimalen Zustand gehalten werden. Dieses wird gewährleistet durch die Struktureigenschaften des Lungengewebes und durch dessen Auskleidung mit pulmonalem Surfactant, einer organspezifischen Lipoproteinmischung. Pulmonaler Surfactant ermöglicht hauptsächlich eine Verminderung der Oberflächenspannung, die auf der Konzentration von Molekülen mit hoher Oberflächenaktivität im Oberflächenfilm an der Luft-Gewebe-Grenze der Lunge beruht.

Untersuchungen von Oberflächeneigenschaften, insbesondere der Oberflächenspannung als Vertreter einer Reihe von biophysikalischen Größen, sind mit einer Vielzahl von Methoden möglich. Das Captive-Bubble-Surfactometer (nach Schürch [101]) ist eine relativ neue Methode, die den besonderen experimentellen Anforderungen einer hohen Oberflächenaktivität unter statischen und dynamischen Bedingungen gerecht wird.

Die vorgelegte Arbeit beschreibt den Aufbau eines Captive-Bubble-Surfactometers als vollständigen Meßplatz für Oberflächenspannungs-Untersuchungen (Kapitel 6) und berichtet die damit erzielten Ergebnisse in der Differenzierung verschiedener Surfactants (Kapitel 8). Künstlich hergestellte Surfactants werden *in vitro* auf ihre biophysikalische Funktion hin getestet. Natürlicher Surfactant aus einem Lungenschädigungsmodell wird hinsichtlich seiner Zusammensetzung und biophysikalischen Oberflächenaktivität untersucht.

Das aufgebaute System läßt sich im weiteren sowohl zur Analyse therapeutischer Surfactants als auch zur Untersuchung von Patientenproben einsetzen.

2 Geschichte der Oberflächenforschung

Die geschichtliche Entwicklung der Oberflächenforschung begann spätestens im Mittelalter mit der systematischen Beobachtung verschiedener Phänomene der Benetzung und Abstossung von öligen und wäßrigen Flüssigkeiten (nach [27]). Franklin errechnete bereits 1765 die dünnstmögliche Schichtdicke des Ölfilms auf der Wasseroberfläche eines nahen Teiches und Young zeigte 1805, daß die besonderen Eigenschaften von Oberflächen mit den mechanischen Eigenschaften einer gedachten Membran verglichen werden können, die über eine flache Oberfläche gebreitet ist und einen bestimmten Spannungszustand einnimmt (nach [66]).

Zur gleichen Zeit und davon unabhängig untersuchte Laplace das mechanische Gleichgewicht einer beliebigen gekrümmten Grenzfläche zwischen zwei Phasen. Die energetischen Phänomene wurden durch erweiterte thermodynamische Fundamentalgleichungen beschrieben (Gibbs-Duhem-Gleichung, nach [18]). Oberflächen und benachbarte Stoffphasen werden mit Hilfe dieser Gleichung durch die Verteilung von unterschiedlich löslichen Substanzen charakterisiert. Für die Charakterisierung der physikalisch-chemischen Oberflächeneigenschaften einer Substanz ist die Adsorption und das Adsorptionsgleichgewicht von Bedeutung, die durch verschiedene theoretische Modelle beschrieben werden.

Die in dieser Arbeit untersuchten biophysikalischen Oberflächeneigenschaften wurden in ihrer Bedeutung für die Medizin erstmals 1929 durch Kurt von Neergard beschrieben [117], der die Unterschiede der Druck-Volumen-Kurven zwischen luftgefüllten und flüssigkeitsgefüllten Lungen auf die Oberflächenspannung zurückführte, die an der Phasengrenze der luftgefüllten Lunge wirksam wird. Untersuchungen an Tierlungen wurden 1958 auch von Pattle durchgeführt [74], dessen grundlegende Experimente das Konzept begründeten, daß eine Senkung der Oberflächenspannung in den Alveolen zur mechanischen Stabilität der Lunge beiträgt und dadurch den Gasaustausch in diesen Strukturen garantiert. In Pattles Arbeit wird der beschreibende Begriff 'alveolar lining layer' für die oberflächenaktive Auskleidung der Alveolen eingeführt, die im folgenden als Mucoprotein bezeichnet wurde und heute die Bezeichnung pulmonaler Surfactant* trägt.

Pulmonaler Surfactant ist im medizinischen Sprachgebrauch das durch bronchoalveoläre Lavage der Lunge gewinnbare Material. Es ist eine nicht leicht zu cha-

* Der Begriff Surfactant wird hier entsprechend dem Sprachgebrauch der physikalischen Chemie sowohl für pulmonalen Surfactant als auch verschiedene andere oberflächenaktive Lösungen und Suspensionen gebraucht.

rakterisierende Mischung von unterschiedlichen Stoffklassen, hauptsächlich von Lipiden und Proteinen. Seine Zusammensetzung ist im Vergleich unterschiedlicher Spezies dennoch sehr konstant und ändert sich wesentlich nur in der perinatalen Entwicklung [111] und bei Erkrankungen der Lunge [78]. Pulmonaler Surfactant sollte zunächst für die Stabilität von offenen und trockenen Alveolen verantwortlich sein, weil Surfactant solchen mechanischen Drücken entgegenwirkt, die ansonsten eine Flüssigkeitsansammlung in den Alveolen und einen Kollaps bei niedrigen Lungenvolumina hervorrufen würden [6]. Clements bezeichnete den Surfactant daher bereits 1957 als 'Anti-Atelektase-Faktor' und wies nach, daß für diese Wirkung der Phospholipidanteil im Surfactant notwendig ist, insbesondere das Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) [23].

Die weitere Aufklärung der Funktionen des pulmonalen Surfactants erforderte eine Konkretisierung der theoretischen Modelle der biophysikalischen Oberflächeneigenschaften der Lunge. Die mikroskopisch beschriebene Lungenstruktur wurde dazu ergänzt durch die Beschreibung ihrer biophysikalischen Funktionseinheiten, den vielen identischen sphärischen Alveolen, an denen reversible und daher stabile thermodynamische Veränderungen stattfinden [19, 89]. Die einzigartige plastische Verformbarkeit der Lunge beruht wesentlich auf diesen speziellen biophysikalischen Oberflächeneigenschaften der Alveolen (vgl. [64, 90, 122]). Erkrankungen der Lunge können durch eine Surfactant-Störung verursacht werden oder auch sekundär zu einer Surfactant-Störung führen. Das in beiden Fällen auftretende Atemnotsyndrom wurde schon in den ersten Beschreibungen, bei Neugeborenen 1959 durch Avery und Mead [4] und 1967 bei Erwachsenen durch Ashbaugh [2], in einen ätiologischen Zusammenhang mit einer Fehlfunktion des Surfactants gebracht, denn die davon betroffenen Alveolen waren ödematös, hämorrhagisch, atelektatisch und irreversibel verklebt.

Der komplexe Stoffwechsel, die Zusammensetzung, Wechselwirkungen, Mangelzustände und indirekte oder direkte medikamentöse Surfactant-Veränderungen werden von zahlreichen Forschern untersucht (vgl. [15, 46, 79, 115]). Die biophysikalischen Untersuchungsmethoden für Oberflächeneigenschaften entwickelten sich dabei unabhängig voneinander in der Medizin und der physikalischen Chemie. In medizinischen Experimenten wurden zunächst Tierlungen *ex vivo* beatmet und der Bronchoalveolarraum zur vergleichenden Untersuchung des resultierenden Oberflächenverhaltens mit verschiedenen Lösungen gespült. Druck-Volumen-Kurven wurden unter maschineller Beatmung aufgezeichnet und schließlich die Oberflächenspannung in einzelnen Alveolen direkt gemessen [103]. Bei Extrakten aus Lungen wurde ein typisches Schäumungsverhalten beobachtet und die Stabili-

tät der Luftbläschen als Kriterium kindlicher Lungenreife vorgeschlagen [75]. Extrahierte Lipide wurden als Oberflächenfilm mit Hilfe der Wilhelmy-Plattenmethode untersucht, dem bewährtesten Instrument zur Oberflächenspannungsmessung. Seit Beginn dieser biophysikalischen Surfactant-Messungen bestand zwischen den relativ hohen, in vitro gemessenen, und den niedrigen, für Alveolen berechneten Oberflächenspannungswerten eine Diskrepanz, die auf methodische Unzulänglichkeiten zurückgeführt wurde [23].

In der deutschsprachigen Literatur wurde 1971 erstmalig eine Methode beschrieben, die an einer halbkugeligen Luftblase die Oberflächenspannung unter dynamischen und statischen Versuchsbedingungen bestimmt [109]. Ein weiteres Meßgerät wird 1977 vorgestellt, das innerhalb einer oberflächenaktiven Probe eine pulsierende halbkugelige Luftblase verwendet, die allerdings ebenso eine zur Umgebung hin offene Grenzfläche aufweist [32]. Erst Schürch entwickelte 1989 ein Meßgerät, das Captive-Bubble-Surfactometer, in dem die Luftblase kugelförmig ist und eine vollständig geschlossene Grenzfläche hat [101].

Mit Hilfe dieser Blasenmethode konnten bestimmte Charakteristika pulmonalem Surfactants, insbesondere dessen hohe Oberflächenstabilität bei niedriger Oberflächenspannung, erstmals in vitro reproduziert werden. In Hinsicht auf biophysikalische Oberflächenaktivität besitzt dieses Meßgerät besondere konzeptionelle und konstruktive Vorteile, die für die Zukunft die weitere Aufklärung der genauen Wirkungsweise biologischer Surfactants ermöglichen können. Eine derartige Meßapparatur wird in der vorliegenden Arbeit konstruiert und zur Messung biophysikalischer Oberflächenaktivität von pulmonalem Surfactant und anderen oberflächenaktiven Stoffen eingesetzt.

3 Oberflächeneigenschaften und Meßmethoden

3.1 Oberflächenspannung

Die Oberflächenspannung kann nur an Phasengrenzflächen auftreten. Als Grenzfläche wird dabei die Fläche zwischen unterschiedlichen, im allgemeinen kondensierten Phasen (Stoffen) bezeichnet, wogegen unter einer Oberfläche die Fläche zwischen der kondensierten und gasförmigen Phase (eines Stoffes) verstanden wird. Grenzflächen und Oberflächen haben eine definierte Schichtdicke, in deren Verlauf die spezifischen Eigenschaften sich von denen der einen Phase zu denen der anderen Phase ändern: Die Dichte nimmt beispielsweise in der Oberfläche zwischen einer Flüssigkeit und ihrem Gas innerhalb von ungefähr 1 nm drastisch und kontinuierlich ab.

Um eine Oberfläche zu vergrößern, ist Energie dafür aufzuwenden, daß Moleküle gegen die innerhalb der Phase wirkenden Kohäsionskräfte an die vergrößerte Oberfläche gelangen können. Die Oberflächenspannung wirkt dabei dem Versuch entgegen, die Oberfläche zu vergrößern und ist definiert als Kraft pro Längeneinheit. Der Kraftvektor liegt eindimensional innerhalb der Oberfläche und zeigt in die entgegengesetzte Richtung der zur Oberflächenvergrößerung jeweils ansetzenden Kraft.

Ein Anschauungsbeispiel für die Oberflächenspannung geht von der mechanischen Spannung aus, einer verwandten Größe der klassischen Mechanik. Diese Spannung wird hervorgerufen, wenn ein Kolben in einem mit Flüssigkeit gefüllten Zylinder bewegt wird. Zur Betrachtung von Oberflächeneigenschaften wird das Beispiel auf zwei Dimensionen reduziert: Eine Flüssigkeitslamelle wird in einem Drahtrahmen aufgespannt (Maxwell-Rahmen), der an einer Seite beweglich ist. Wird diese Seite zur Vergrößerung der Lamelle bewegt, so ist die dafür aufzubringende Kraft F gleich der Oberflächenspannung γ mal der Seitenlänge l mal 2 Lamellenseiten. Daher ergibt sich aus $F = 2\gamma \cdot l$ für die Einheit* der Oberflächenspannung: $[\gamma] = 1Nm^{-1}$.

Wird in dem oben beschriebenen Modell der Bügel um eine Strecke dx bewegt und damit die Oberfläche der Lamelle um $2l dx$ vergrößert, so besitzen die Moleküle in der Oberfläche einen um den Betrag $\gamma = Fdx/2l dx$ höheren Energiegehalt als die Moleküle in der darunter liegenden Phase. Entsprechend sind Flüssigkeitstropfen rund, weil sie als Kugeln einen Zustand der geringsten Oberfläche und damit geringsten freien Energie γ einnehmen.

* 1 mNm⁻¹ entspricht der früher benutzten Einheit 1 dyne/cm.

Eine Einheiten-Umrechnung zu $[\gamma]=1\text{ Jm}^{-2}$ verdeutlicht, daß die Oberflächenspannung thermodynamisch als Energiegehalt pro Flächeninhalt zu verstehen ist. Der Energiegehalt der Oberfläche ist dabei temperaturabhängig: Die Oberflächenspannung vieler Flüssigkeiten nimmt bei 1 K Temperaturerhöhung um ungefähr 0.1 mNm^{-1} über einen weiten Bereich linear ab (Eötvös-Beziehung). Zum kritischen Punkt der Flüssigkeit hin (Wasser: 374 °C , 22 MPa) wird die Oberflächenspannung null, weil die Molekülkonzentrationen in der Oberfläche und ihrem Dampf sich annähern und die Oberfläche nicht mehr abgrenzbar ist.

Die Oberflächenspannung entspricht zusammenfassend der Energiedifferenz zwischen Molekülen an unterschiedlichen Stellen einer Flüssigkeit: Oberflächen-Moleküle sind energiereicher als die darunter liegenden Moleküle. Der höhere Energiegehalt hängt ab von dem Übermaß an zwischenmolekularen Kräften der oberflächlichen Moleküle, deren Vektorraum sich nur in das Innere der Flüssigkeit erstrecken kann. Die Oberflächenspannung ist um so größer, je stärker die zwischenmolekularen Kräfte im Innern der Flüssigkeit sind und dadurch Moleküle aus der Grenzfläche ins Innere ziehen. Die meist gegen Luft gemessenen Werte wachsen in der folgenden Reihenfolge: kondensierte Edelgase, Alkane, Alkohole, Wasser, Salzschnmelzen, flüssige Metalle (Beispiele: Wasser 72.8 mNm^{-1} , Quecksilber 486 mNm^{-1} ; jeweils bei 20 °C). Substanzen mit Wasserstoffbrückenbindungen weisen eine höhere Oberflächenspannung auf als polare Substanzen ohne Wasserstoffbrücken. Niedrige Werte zeigen unpolare Flüssigkeiten.

3.2 Oberflächenaktivität

Die Oberflächenaktivität hängt im wesentlichen von dem sogenannten Oberflächenüberschuß ab. Der Oberflächenüberschuß ist dabei ein Maß für die Verteilung von Teilchen in einer Lösung. In der Oberfläche σ einer Lösung ist der Überschuß Γ für n Teilchen einer Substanz J definiert zu $\Gamma_J = n / \sigma$. Wenn der Überschuß positiv ist, reichert sich die Substanz in der Oberfläche an, anderenfalls reichert sie sich unterhalb der Oberfläche, in der Subphase, an. In beiden Fällen kann man von grenzflächenaktiven Substanzen sprechen: Sie entfalten ihre Wirkung an der Grenzfläche (Oberfläche) zwischen zwei Phasen. Im engeren Sinne werden jedoch nur solche Stoffe als oberflächenaktiv bezeichnet, die eine Erniedrigung der Oberflächenspannung bewirken.

Ein Detergenz, beispielsweise Natriumdodecylsulfat (SDS), ist eine solche Substanz, die charakteristischerweise in dem kleinen Raum zwischen einer öligen und wäßrigen Phase verteilt ist. Für niedrige Konzentrationen c_D des Detergenz D bei konstanter Temperatur T nimmt die Gibbsche Gleichung folgende Form an:

$(\partial\gamma / \partial c_D)_T = -RT \cdot \Gamma_D c_D$ mit Gaskonstante $R=8.3 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$ (Herleitung [3]). Diese Beziehung bedeutet, daß die Oberflächenspannung konzentrationsabhängig abnimmt (Term auf linker Seite negativ), weil das Detergenz sich in der Grenzfläche (Oberfläche) anreichert ($\Gamma_D c_D$ positiv).

In niedrigen Konzentrationsbereichen kann dabei die in der Oberfläche gelöste Substanz als Gas betrachtet werden, dessen Ausdehnung zweidimensional ist: $\Pi\sigma = n_D \cdot RT$ [3], wobei der Oberflächendruck Π gewöhnlich die Differenz zwischen der Oberflächenspannung γ_0 der reinen Oberfläche σ und der Oberflächenspannung γ bei gelöster oberflächenaktiver Substanz ist: $\Pi = \gamma_0 - \gamma$. Der Oberflächendruck Π hat die gleiche Maßeinheit wie die Oberflächenspannung und ist vorstellbar als seitlich wirkender Druck, der innerhalb der Grenzfläche durch die Zahl der Moleküle verursacht wird. In vielen Experimenten ist γ^0 der Ausgangswert der Oberflächenspannung. Eine reine Wasseroberfläche mit einer Oberflächenspannung (γ^0) von 70 mNm^{-1} hat somit einen Oberflächendruck (π) von 0 mNm^{-1} . Sinkt durch eine oberflächenaktive Substanz die Oberflächenspannung auf 20 mNm^{-1} , dann ist der Oberflächendruck 50 mNm^{-1} .

Zwischen der Konzentration c einer löslichen, oberflächenaktiven Substanz und der Oberflächenspannung besteht zusätzlich die empirische Beziehung der Szyszkowski-Gleichung zu $\gamma_0 - \gamma = a \cdot \ln(1 + c/b)^\ddagger$ über einen weiten Konzentrationsbereich mit den Stoffkonstanten a und b [118]. Neben der beschriebenen Oberflächenaktivität werden solche Stoffe als oberflächeninaktiv bezeichnet, die die Oberflächenspannung erhöhen. Hierzu gehören hydroxylreiche Zucker und anorganische Salze, die aufgrund starker elektrostatischer Wechselwirkung von einer Hülle aus Wassermolekülen umgeben sind. Um ein Ion in die Oberfläche einzubauen, muß Energie zum Abstreifen der Hülle aufgebracht werden; das System kann daher durch Molekülbewegung in die Oberfläche (Adsorption, Kap. 3.4) keinen niedrigeren Energiegehalt erreichen.

3.3 Gekrümmte Oberflächen

Die mechanischen und thermodynamischen Vorgänge wurden zuvor für zwei Phasen beschrieben, die in einer ebenen Oberfläche aufeinandertreffen. Für den häufig anzutreffenden Fall, daß die Oberfläche gekrümmt ist oder ein Ausschnitt einer Sphäre darstellt, ist unter der Einwirkung der Oberflächenspannung nur

[‡] Die Gleichung ist äquivalent zur Adsorptionsgleichung $\Pi = RT \cdot \Gamma^\infty \cdot \ln(1 + c/b)$ mit Oberflächendruck Π , Gaskonstante R , Temperatur T , Oberflächenüberschuß bei Sättigung Γ^∞ sowie Langmuir-von Szyszkowski Verteilungskonstante b [76].

dann eine mechanische Stabilität gewährleistet, wenn die Phasen ihrerseits unter unterschiedlichen Drücken stehen. Der Vektor der Oberflächenspannung ist in diesem Fall vorstellbar als Summe der Vektoren der Oberflächenaktivität einzelner Teilchen. Durch die Anordnung der oberflächenaktiven Teilchen entlang einer gekrümmten Oberfläche erhält der Summenvektor einen zusätzlichen Anteil, der senkrecht zur Oberfläche in das Innere einer Phase gerichtet ist.

Dieser zentripetale Druckanteil wird als kapillarer Krümmungsdruck p_k bezeichnet und entspricht der Druckdifferenz zwischen den Phasen. Wird ein mehreckiges Segment der Oberfläche einer Kugel vergrößert und dadurch abgebildet auf ein größeres Segment, so besitzen die Segmente die Krümmungsradien R_1 und R_2 . Dann gilt unter Gleichgewichtsbedingungen die nach Laplace* benannte Gleichung $p_k = \gamma \cdot (1/R_1 + 1/R_2)$ mit Oberflächenspannung γ zwischen den Kugelsegmenten. Diese Gleichung läßt sich auf eine große Zahl von Beobachtungen anwenden. Der kapillare Krümmungsdruck p_k wird um so größer, je kleiner die Radien R werden. Für eine Kugel mit $R_k = R_1 = R_2$ gilt dementsprechend $p_k = 2\gamma / R_k$. Diese Beziehung bedeutet, daß zur Vergrößerung einer Kugel um so mehr Druck dem p_k entgegen aufgebracht werden muß, je kleiner die Kugel ist und je größer damit die Oberflächenspannung ist.

Ein bekanntes Beispiel ist das Aufblasen eines Luftballons, bei dem die ersten, kleinen Vergrößerungen die größten Anstrengungen erfordern. Weiterhin werden zwei verbundene und verschieden große ($R_1 < R_2$) Seifenblasen ihr Volumen nicht ausgleichen, sondern noch unterschiedlichere Größen annehmen, weil die kleinere Blase (durch ihren nach innen wirkenden, höheren kapillaren Krümmungsdruck) die größere weiter aufbläst. Für eine (oben beschriebene) ebene Grenzfläche mit $R_1 = R_2 = \infty$ ergibt sich der kapillare Krümmungsdruck damit zu $p_k = 0$.

Diese klassische Laplace-Gleichung gilt auch für R_1 und R_2 als Hauptkrümmungsradien der größten, zweidimensional abgebildeten Schnittfläche eines eingetauchten Rotationsellipsoids [93]. Dessen Geometrie ergibt sich aus den unterschiedlichen Kraftanteilen des Auftriebs und der Oberflächenspannung entlang seiner Begrenzung, die den Körper in einer seitlichen Ansicht sphärisch oder ellipsoid verformen (vgl. Beispiele in Abb. 1, S. 14). Die Oberflächenspannungen von solchen Körpern (hier: Blasen), die nicht allseitig achsensymmetrisch sind und nicht unmittelbar durch die Laplace-Gleichung beschrieben werden, können berechnet werden unter der Voraussetzung, daß zwischen einer gegebenen Blase und ihrer

* Graf Pierre Simon Laplace, 1749 (Beaumont-en-Auge) bis 1827 (Paris), Mathematiker, Astronom, Politiker. Hauptwerk: *Traité de Mécanique Céleste*; Crapelet, Courcier, Paris, 1798-1827. Differentialform der Laplace-Gleichung: $p\Delta V = k\Delta A$ [90].

Umgebung jeweils Kontaktwinkel von 180° bestehen und die Oberflächen über eine gewisse Strecke parallel zueinander verlaufen. Eine solche scheibenartig flache, sogenannte semi-infinite Blase weist eine Oberflächenspannung von $\gamma = \rho g h^2/4$ auf, mit spezifischer Dichte der Flüssigkeit ρ , Erdbeschleunigung g und maximaler Blasenlänge h (zitiert in [61]).

Eine abgeflachte, aber halbkugelförmige Blase kann im Gegensatz dazu nur zur Unterlage einen Kontaktwinkel von 180° aufweisen und hat im Bereich der (halbkugelförmigen) Wölbung einen deutlich kleineren Kontaktwinkel zur Umgebung. Die Oberflächenspannung wird in diesem Fall mit einem empirischen Korrekturglied bestimmt zu $\gamma = \rho g h^2/G_r^2$ [61]. Das Polynom G_r beschreibt hier das Verhältnis der Oberflächenspannung einer hypothetischen, aber exakt berechenbaren semi-inifiniten Blase zu der unbekanntem Oberflächenspannung der tatsächlich beobachteten Blase. Es ist als Korrekturglied der Oberflächenspannung eine Funktion des Verhältnisses $r=h/d$ der Höhe h zu Durchmesser d der beobachteten Blase (Kap. 7.12). Zur Berechnung der Oberflächenspannung ist es dann nicht weiter notwendig, daß die Blasengeometrie tatsächlich semi-inifinit (flach, $r \rightarrow 0$) oder infinit (sphärisch, $r \rightarrow 1$) ist. Das Polynom G_r interpoliert dazu als Korrekturglied die Oberflächenspannung zwischen diesen Extremwerten der Blasengeometrie (Abb. 8, S. 50).

3.4 Weitere Kenngrößen von Oberflächen

Neben der Oberflächenspannung, die unter statischen und dynamischen Bedingungen wirksam werden kann, gibt es eine Reihe weiterer Parameter, mit denen Oberflächen charakterisiert werden können. Zwischen den Zuständen der minimalen und maximalen Oberflächenspannung während eines Versuchsabschnittes sind bei oberflächenaktiven Substanzen besondere Fließvorgänge zu beobachten. Von diesen rheologischen Eigenschaften wird häufig die Viskosität zur Beschreibung der inhomogenen Energieverteilung in dem fließenden System benutzt. Die Viskosität ist dabei definiert als Proportionalitätsfaktor zwischen der Schubspannung τ und der Schergeschwindigkeit D . Bei der Messung der Oberflächenspannung spielt die Viskosität der verschiedenen beteiligten Volumenelemente daher nur im dynamischen System eine Rolle [18]. Die Viskosität bestimmt in einem solchen System die Wirkung der angreifenden Kräfte auf die Strukturveränderung und damit auf die Bildung oberflächenaktiver Molekülaggregate in der Oberfläche. Das Pulsierende-Blase-Surfactometer zeigt deutliche viskositätsabhängige Effekte bei 20 Pulsationen pro Minute [42]. Diese Effekte stellen im Zusammen-

hang mit der irregulären Blasen-Deformation die Anwendung der Messung des Krümmungsdrucks zur Bestimmung der Oberflächenspannung in Frage.

Auch die Spreitungsgeschwindigkeit einer Substanz in der Oberfläche ist von der Viskosität der Flüssigkeit abhängig, die eine nicht zu vernachlässigende Interaktion zwischen der Oberfläche und dem Inneren der Flüssigkeit anzeigt [1]. Steigt an einer Stelle der Oberfläche die Oberflächenspannung, entsteht eine geringfügige Oberflächenvergrößerung, die zu einem ebenfalls viskositätsabhängigen Materialfluß in die Oberfläche führt. Dies entspricht dem Marangoni-Effekt, der beispielsweise aufgrund der Ethanol-Verdunstung an den auslaufenden Tropfen eines geschwenkten Weinglases zu beobachten ist und auch Messungen mit der Wilhelmy-Plattenmethode beeinträchtigt [12]. Weitere substanzspezifische Eigenschaften wie Dampfdruck, Wärmekapazität, elektrische Leitfähigkeit oder Brechungsindex sind in der Oberfläche ebenfalls verändert und können daher zu deren Charakterisierung bestimmt werden.

Aus dem Verlauf eines Oberflächenspannungs-Oberflächen-Diagramms (Abb. 33, S. 92) können neben den Maximal- und Minimalwerten der Oberflächenspannung noch weitere Parameter abgeleitet werden: Die zur Erreichung einer niedrigen Oberflächenspannung notwendige Kompression der Oberfläche ist ein Maß für die Steifigkeit des ausgebildeten Filmes. Ein stark geordneter Film aus einer hochangereicherten Substanz kann (und muß) nur gering komprimiert werden, um eine minimale Oberflächenspannung darzustellen; seine Diagramm-Kurve verläuft entsprechend steil. Die Kompressibilität beschreibt diese Steifigkeit des Oberflächenfilms als Tangentensteigung k eines gegebenen Oberflächenspannungs-Oberflächen-Diagramms zu $k = 1/A \cdot (dA/d\gamma)$ mit Oberfläche A bei Oberflächenspannung γ .

Wird ein Film nach Erreichen einer minimalen Oberflächenspannung weiter komprimiert, kann es zu einer weiteren Reduktion der Oberfläche bei mehr oder weniger unveränderter Oberflächenspannung kommen: Diese Überkompression zeigt sich als horizontales Plateau im Oberflächenspannungs-Oberflächen-Diagramm. In verschiedenen Kompressionen der Oberfläche kann dieses Plateau eine unterschiedliche Länge (bezogen auf die Oberfläche) zeigen; Verhältnisse dieser Längen werden als Kollaps-Plateau-Ratios angegeben. Eine Folge dieser Überkompression und des damit einhergehenden Filmkollaps können unterschiedliche Diagramm-Abschnitte sein, bei denen sich während der Oberflächen-Expansion eine höhere Oberflächenspannung einstellt als bei der gleichen Oberfläche unter Kompression.

Die durch den Verlauf des Kompressions-Expansions-Diagramms umschriebene Fläche wird als Hysterese-Fläche bezeichnet und qualitativ und quantitativ in aufeinanderfolgenden Zyklen beurteilt. Die Verläufe der Diagramme von Zyklen eines Versuches können sich deutlich unterscheiden und insbesondere zu Versuchsbeginn oder nach einem Kollaps ist eine Zunahme der Oberflächenaktivität zu beobachten. In dynamischen Versuchen wird das Erreichen einer gewissen niedrigen Oberflächenspannung durch die Halbwertzeit oder Anzahl der Kompressionszyklen beschrieben.

Während der Adsorption von oberflächenaktivem Material in die Oberfläche wird eine kontinuierliche Senkung der Oberflächenspannung beobachtet, die zunächst durch eine beabsichtigte, kurzzeitige Erhöhung der Oberflächenspannung ausgelöst wird. Die anschließende Kinetik der Adsorption wird in diesen Versuchen durch die Adsorptions-Halbwertzeit der Senkung der Oberflächenspannung gekennzeichnet. Die niedrigste Oberflächenspannung, die in der Gleichgewichtsphase nach diesem exponentiellen Abfall erreicht wird, ist ein Maß für die Lage des Konzentrationsgleichgewichts des oberflächenaktiven Materials zwischen Grenzfläche und Subphase. In Stabilitätsversuchen wird die Rückkehr aus dem hochkomprimierten, metastabilen Zustand in den Gleichgewichtszustand und der damit verbundene Anstieg der Oberflächenspannung durch die Desorptions-Halbwertzeit oder Desorptionsgeschwindigkeit quantifiziert.

3.5 Herkömmliche Meßmethoden für die Oberflächenspannung

Die Methoden zur Messung der Oberflächenspannung lassen sich unterscheiden in statische Methoden, die ein Kräftegleichgewicht zwischen Oberflächenkraft und anderen mechanischen Kräften untersuchen, und dynamischen Methoden, die wiederkehrende Veränderungen der Oberfläche messen. Von den zahlreichen Verfahren ist zunächst die Wilhelmy-Plattenmethode zu nennen, die die Oberflächenspannung als Gewichtskraft einer Platte mißt. Diese Platte ist von der zu messenden oberflächenaktiven Substanz überzogen und wird in einem Trog aufgehängt, dessen Flüssigkeit mit einem Oberflächenfilm dieser Substanz bedeckt ist. Die Oberfläche kann langsam verändert werden und dadurch eine unterschiedliche Packungsdichte des Oberflächenfilms eingestellt werden. Zur Ausbildung eines einschichtigen Films wird ungefähr $0.1 \mu\text{g}$ DPPC aufgebracht, das sich durch Spreitung auf der Oberfläche von 300 cm^2 verteilt ($0.0003 \mu\text{gcm}^{-2}$).

Die Oberflächenspannung wird dann üblicherweise als Funktion der Oberfläche dargestellt. Diese Kurve wird als Oberflächenspannungs-Oberflächen-Isotherme bezeichnet, weil für diesen Versuch ein konstanter Energiegehalt in dem System

angenommen wird. Eine solche Isotherme kann einen charakteristischen Verlauf dadurch zeigen, daß die gemessenen Werte eine Schleife im Uhrzeigersinn (Abb. 17, S. 60) beschreiben. Diese Darstellung der mit der Wilhelmy-Plattenmethode kontinuierlich erfassbaren Meßwerte wird häufig auch zum Vergleich mit den diskreten Meßwerten anderer Methoden gewählt.

Die Langmuir-Waage verwendet ebenfalls einen Trog, der bis zum Rande mit ungefähr 500 ml Flüssigkeit gefüllt ist, und mißt den Oberflächendruck, der auf eine auslenkbare Schranke ausgeübt wird. Eine bewegliche Schranke dient dabei zur Veränderung der Oberfläche, die der aufgebracht Substanz zur Spreitung zur Verfügung steht. Die Kraft pro Längeneinheit der Schranke, die zur Rückstellung der Auslenkung durch die Wirkung der oberflächenaktiven Substanz erforderlich ist, entspricht dem Oberflächendruck und ist gleich der Differenz der Oberflächenspannung zur unbeschichteten Wasseroberfläche.

Beide Trog-Methoden erfordern einen beträchtlichen apparativen Aufwand (Feuchtigkeits-kontrollierte Versuchsatmosphäre [26]; Teflontrog, automatische Nachregelung der Oberfläche, Priming [48]). Meßbare Verluste an oberflächenaktivem Material können konstruktionsbedingt nicht verhindert [1] und unterschiedliche Benetzungen der Platte [12] meßtechnisch nicht korrigiert werden. Maximal schnelle motorische Veränderungen der Oberfläche liegen im Bereich von lediglich $10 \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ ($1\text{--}5 \text{ \%s}^{-1}$ der Ausgangsfläche) [32].

Die Blasendruckmethode nutzt die gekrümmte Oberfläche einer halbkugeligen Blase am Ende einer Kapillare in einer Flüssigkeit, um den maximal erreichbaren Überdruck vor Abreißen der Blase als Kapillardruck zur Berechnung der Oberflächenspannung zu bestimmen. Die Steighöhenmethode mißt den Flüssigkeitsstand in einer eingetauchten Kapillare. Dabei steigt die Flüssigkeit aufgrund der Oberflächenspannung solange auf, bis durch ihre der Oberflächenspannung entgegenwirkende Gewichtskraft ein Gleichgewicht erreicht wird. Die direkte Untersuchung der Oberfläche ist mittels Oberflächen-Laserlichtstreuung und Oberflächenwellen-Methoden möglich, die die Viskosität und Oberflächenspannung durch Doppler-Eigenschaften von Reflexionen und Wellenanalyse der Oberfläche ermitteln. Eine weitere dynamische Methode ist die Spinning-Drop-Methode, bei der inmitten einer Kapillare ein unlöslicher Flüssigkeitstropfen zylindrisch in einer anderen Flüssigkeit schwimmt; bei schneller Rotation der Kapillare können damit äußerst niedrige Oberflächenspannungen gemessen werden.

Das Pulsierende-Blase-Surfactometer ist eine fast vollständig automatisierte Meßapparatur und bestimmt die Oberflächenspannung direkt aus einem gemessenen Druckgradienten (p_k) über einer halbkugeligen lufthaltigen Blase, die in

einer Lösung oberflächenaktiven Materials an einer Kapillare hängt [32]. Die Minima und Maxima der Druckwerte werden in Abhängigkeit von der Zykluszahl dargestellt. Der Berechnung der Oberflächenspannung aus den Druckwerten liegt die Laplacesche Annahme der Blase als Kugel zu Grunde; die auftretende Formabweichung der Kugel zu einer Scheibe wird nicht berücksichtigt [42].

Die geringe Größe der Blase (≈ 1 mm) erlaubt schnelle maschinelle Zyklen der Blasenvergrößerung (Oberflächen-Expansion, -Dilatation) und Verkleinerung (Kompression), wobei bei hochoberflächenaktiven Substanzen die Blase allerdings häufig abreißt. Statische Messungen sind kaum durchführbar, denn ein Materialverlust aus der Oberfläche in das Lumen der offenen Kapillare des Pulsierende-Blase-Surfactometers kann nicht verhindert werden.

Die Pendant-Drop- und Sessile-Drop-Methoden beruhen ebenfalls auf der Untersuchung eines einzelnen Tropfens, dessen Oberflächenaktivität durch seine Spreitung auf einer Oberfläche mit bekannter Oberflächenspannung bestimmt werden kann. Durch ingenieure Mikropunktion vieler Alveolen und das Einbringen je eines solchen Mikrotropfens einer Flüssigkeit bekannter Oberflächenaktivität gelang es in umgekehrter Weise, die Oberflächenspannung der Oberfläche einzelner Alveolen direkt zu bestimmen [103]. Die Berechnungen der Oberflächenspannung beruhen dabei auf der Messung des Tropfendurchmessers. Die Berechnung von Randwinkel, Volumen, Oberfläche und Oberflächenspannung erfolgt aus der Geometrie des Tropfens in Seitenansicht und Aufsicht [53].

3.6 Das Captive-Bubble-Surfactometer als eine neue Meßmethode für die Oberflächenspannung

Das Captive-Bubble-Surfactometer unterscheidet sich maßgeblich durch die Form der eigentlichen Grenz- respektive Oberfläche von den herkömmlichen Meßmethoden für die Oberflächenspannung. Diese Meßmethode realisiert eine gekrümmte und völlig intakte Oberfläche einer ungefähr 6 mm durchmessenden Luftblase, die unter einer Decke aus Agarose flutet. Das an der Oberfläche stark hydrophile und zu 99 % aus Wasser bestehende Agarose-Gel gewährleistet, daß jederzeit eine dünne Schicht der wäßrigen Testflüssigkeit die Luftblase vollständig umgibt. Dieses Prinzip erlaubt es, den Randwinkel zwischen der flachen Oberseite der Blase und der Flüssigkeit als 180° anzunehmen [61, 101].

Dieser als semi-inifinit (Kap. 3.3) bezeichnete Randwinkel ist Voraussetzung zur Berechnung der Oberflächenspannung. Eine hohe Oberflächenspannung wirkt dabei an einer kugeligen Blase, während eine niedrige Oberflächenspannung eine extreme Abflachung der Luftblase unter der Deckelschicht ermöglicht (Abb. 1).

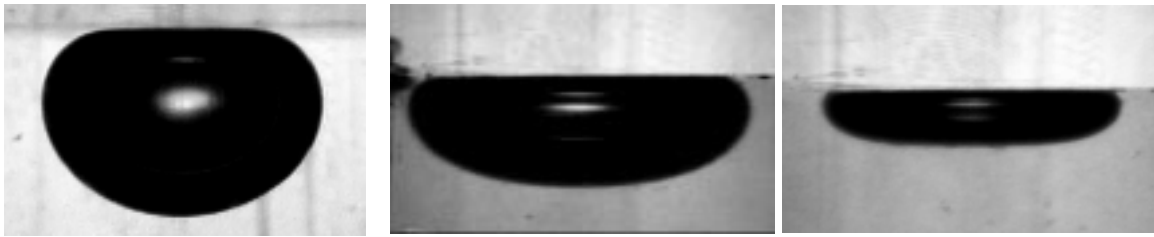


Abb. 1: Funktionsprinzip des Captive-Bubble-Surfactometers

Beispiel für eine Luftblase mit hoher Oberflächenspannung (70 mNm^{-1}) an der Grenzfläche zwischen reinem Wasser und Luft. Diese Seitenansicht zeigt eine annähernd halbkugelige, gering abgeflachte Geometrie. Das Verhältnis von Höhe zu Durchmesser (h/d) der Luftblase in der Abbildung ist 0.68 (vgl. Abb. 8, S. 50).

Beispiel für eine Luftblase mit mittlerer Oberflächenspannung (23 mNm^{-1}) bei künstlichem Surfactant. Die zentripetal wirkende Oberflächenspannung ist niedriger als bei Wasser (links) und wirkt dem Auftrieb der Luftblase weniger entgegen. Die Luftblase wird daher durch ihren Auftrieb stark abgeflacht; $h/d=0.33$.

Beispiel für eine Luftblase mit minimaler Oberflächenspannung (2 mNm^{-1}) bei Lipid-Extraktions-Surfactant. Da die Oberflächenspannung minimal ist, wirkt sie überhaupt nicht mehr einer Abflachung entgegen, die durch den hydrostatischen Überdruck in der Probe und den Auftrieb verursacht wird; $h/d=0.18$.

Im letzteren Fall ist die grenzflächenverkleinernde Kraft (die Oberflächenspannung) gegenüber der Auftriebskraft drastisch herabgesetzt. Auch solche Zustände können mit diesem Meßinstrument erfaßt werden und mit einem analytischen Verfahren berechnet werden, das die für andere Meßmethoden geforderte strenge Einhaltung einer kugeligen Blasenform hinfällig machte [93]. Dabei wird die objektive Randfunktion der Blase im seitlichen Schnittbild konstruiert und anschließend deren Oberflächenspannung nach der Laplace-Differentialgleichung analytisch berechnet.

In einem rechentechnisch vereinfachenden Ansatz zur Messung der Oberflächenspannung kann auch ein schnelleres numerisches Verfahren eingesetzt werden, indem eine Blase als definierter Rotationskörper betrachtet wird [85]. Die Oberflächenspannung, das Volumen und die Oberfläche der Blase werden dann mit Hilfe der beobachteten Geometrie (Blasenhöhe und -durchmesser) approximiert an bekannte Werte einiger Referenzblasen mit bekannter Geometrie [96].

Die Steuerung des Captive-Bubble-Surfactometers erfolgt über die Veränderung der Geometrie der Blase, wobei die Oberflächenspannung von dem Verhältnis der Zahl oberflächenaktiver Moleküle zur Oberflächengröße abhängt (Kap. 3.2, S. 6). Die Oberflächengröße A nimmt dabei mit dem Blasenvolumen V zu, während das

Blasenvolumen dem Blasendruck p antiproportional ist.* Durch die Steuerung des Drucks wird daher eine zunächst unbekannte Änderung der Oberfläche hervorgerufen; anschließend können die aktuelle Oberflächengröße und die damit einhergehende Oberflächenspannung bestimmt werden.

Das Captive-Bubble-Surfactometer ermöglicht sowohl statische als auch dynamische Messungen. Oberflächenspannungen von unter 1 bis 75 mNm^{-1} werden reproduzierbar erfaßt [84]. Die geschlossene Konstruktion des Captive-Bubble-Surfactometers hat zur Folge, daß keine Mindestkompressions-Geschwindigkeit notwendig ist, um niedrige Oberflächenspannungen zu erzielen, sondern es lassen sich unter schrittweiser (quasi-statischer) Oberflächenreduktion gegen null gehende Oberflächenspannungen einstellen.

Erst das Captive-Bubble-Surfactometer konnte bei diesen sehr niedrigen Werten zeigen, daß ein solcher metastabiler Filmzustand durchaus längere Zeit (Stunden) bestehen kann [101]. Unwiederbringlicher Verlust von Oberflächenmaterial bei den meisten anderen Methoden, insbesondere aber bei der Wilhelmy-Plattenmethode, muß aber durch eine solche Mindestkompressionsrate kompensiert werden, obwohl auch dieses nicht zu stabil-niedrigen Oberflächenspannungen führt. Der Volumenverlust der Blase durch druckabhängiges Lösen von Luft in der Testflüssigkeit begrenzt die Versuchsdauer im Captive-Bubble-Surfactometer auf Stunden; die relativ große Blase ist gut zu beobachten und zu vermessen. Es ist nicht notwendig, aber möglich, Testsubstanzen direkt auf die Oberfläche aufzubringen. Der Versuchsablauf kann teilweise automatisiert werden, häufig ist aber eine manuelle Bedienung notwendig.

* Die genaue Beziehung zwischen A und V hängt von der beobachteten Geometrie der Blase ab; prinzipiell ist A eine Potenzfunktion von V . Für isotherme Zustandsänderungen gilt das Gesetz von Boyle-Mariotte: $p \cdot V = \text{const.}$

4 Bestandteile, biophysikalische Wirkungsweisen und Eigenschaften des pulmonalen Surfactants

4.1 Bestandteile des pulmonalen Surfactants

Natürlicher Surfactant, der durch bronchoalveoläre Lavage gewonnen wird und sich durch Dichtegradientenzentrifugation anreichern lässt, besteht aus Lipiden (Gewichtsanteil 90 %), Proteinen (10%) und einem geringen Anteil an Kohlehydraten [46]. Die Phospholipide unter den Lipiden sind die Träger der Oberflächenaktivität des pulmonalen Surfactants.

Die Proteine, die spezifisch nur im Surfactant auftreten, werden als Surfactant-Proteine SP-A, SP-B und SP-C bezeichnet und entsprechen ungefähr der Hälfte des Gesamteiweiß. Diese Proteine zeigen eine unterscheidbare und reproduzierbare, aber insgesamt komplexe biophysikalische Wirkungsweise des pulmonalen Surfactants, die im wesentlichen auf der Vermittlung zwischen verschiedenen makromolekularen Aggregatzuständen der Proteolipide in der Subphase und in der Oberfläche beruht [78]. Das von zahlreichen, aber nicht allen Autoren zu diesen spezifischen Proteinen gezählte SP-D tritt ebenfalls in der Magenmukosa auf und wird hier nicht weiter vorgestellt, weil seine Bedeutung für die biophysikalische Wirkungsweise des pulmonalen Surfactants bisher unbekannt ist.

Die verschiedenen Surfactant-Proteine treten dabei mit Phospholipiden an verschiedenen Stellen innerhalb der Alveole zu unterschiedlichen Ultrastrukturen zusammen. Weniger als 1 % dieses alveolären Surfactants geht über die Atemwege verloren, doch wird dadurch eine Surfactant-Auskleidung der (kleinen) Atemwege gewährleistet und dort eine Senkung der Oberflächenspannung auf ungefähr 25 mNm^{-1} verursacht [67].

4.1.1 Surfactant-Proteine

Das hydrophile Glykoprotein SP-A macht den größten Anteil der Surfactant-Proteine aus und ist genetisch stark konserviert [115]. Es trägt eine Kohlenhydrat-Erkennungs- und eine Kollagendomäne und oligomerisiert zu einem Komplex aus sechs Trimeren. SP-A ist intrazellulär im Endoplasmatischen Retikulum, im Golgi-Apparat und in multilamellären Vesikeln nachzuweisen [124]. Extrazellulär kommt SP-A im tubulären Myelin, das wahrscheinlich den expandierten Inhalt von Lamellarkörpern darstellt, vor [47]. Alveoläre Makrophagen tragen einen spezifischen Rezeptor für SP-A, der die oxidativen und phagozytären Abwehrfunktionen dieser Zellen moduliert [79]; SP-A-Rezeptoren auf Typ-II-Zellen fördern die Wiederaufnahme und hemmen die Sekretion von Surfactant-

Phospholipiden [125]. Im zellfreien System kann SP-A dazu zusätzlich und selektiv an DPPC, Phosphatidylglycerol und SP-B binden [126]. Die Oberflächenaktivität von SP-A wurde an Lipid-Extraktions-Surfactants (LES) untersucht [104]; konzentrationsabhängig wurde durch SP-A-Zugabe eine Verkürzung der Adsorptionszeit, eine Verminderung der Oberflächenreduktion zum Erreichen einer niedrigen Oberflächenspannung und eine Minderung von Instabilitätsphänomenen erreicht. Die biophysikalische Funktion des SP-A wird zusammenfassend als Promotor einer Sortierung und Strukturierung der Oberfläche beschrieben und ist damit eher in der Initialphase der Ausbildung eines Oberflächenfilms von Bedeutung [81].

Neben dem hydrophilen SP-A enthält pulmonaler Surfactant die beiden kleineren und stark hydrophoben Proteine SP-B und SP-C. Im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat befinden sich Vorstufen des SP-B, während in multilamellaren Körpern fertig prozessiertes SP-B vorliegt. Beide Proteine können selbst hoch komprimierbare Monoschichten formen, in denen die α -helikalen Proteinabschnitte parallel zur Oberfläche angeordnet sind. Sie fördern Adsorptionsvorgänge durch Destabilisierung der Lipid-Doppelschichten von Molekülaggregaten in der Subphase [108]. SP-B entfaltet in einem rekonstituierten Surfactant unter Kalzium-Zusatz die größte Wirkung auf die Adsorption [126]. SP-B und SP-C ermöglichen dazu eine noch nicht näher beschriebene Bindung von solchen Vesikeln an einen Oberflächenfilm, aus denen die Phospholipide in die Oberfläche eingebaut werden [70]. Die Auffüllung eines inkompletten Oberflächenfilms während einer Expansion vermitteln SP-B und SP-C durch Fusion von auseinandergerissenen Inseln aus Phospholipidschichten [114]. Zusätzlich sind sie für die Dauer des Bestehens metastabiler Zustände mit niedrigster Oberflächenspannung von Bedeutung [81]. Ein Ausschluß von SP-B- und SP-C-DPPC-Komplexen aus dem Oberflächenfilm geschieht bei Kompression auf 15 mNm^{-1} . Bemerkenswerterweise konnte SP-B ein Phospholipidgemisch unterhalb dessen Temperatur der Gel-Flüssigkeits-Transition ($39 \text{ }^\circ\text{C}$) in der Grenzfläche räumlich ordnen und dadurch die Oberflächenaktivität erhöhen [5].

Die Funktion rekonstituierten Surfactants ist an elektrostatische Wechselwirkungen gebunden, die das SP-B mit Phospholipiden der Oberfläche eingehen kann: Hydrophile Bereiche des SP-B interagieren mit den polaren Lipidkopfgruppen, hydrophobe mit deren Alkylketten und erhöhen so die laterale intermolekulare Ordnung [24]. SP-C hingegen interagiert mit Alkylketten von Phospholipiden und bindet über Thioesterbrücken kovalent an Palmitinsäure.

Es ist schwierig, die Funktionsweisen der interagierenden Surfactant-Proteine an der alveolären Oberfläche allein aus in vitro-Messungen der Oberflächenaktivität abzuleiten. Die hier dargestellten, bekannten Funktionen der Surfactant-Proteine konnten durch Untersuchungen der Proteinstruktur [24, 116] und der elektronenmikroskopischen Ultrastruktur [115, 121] zusätzlich erhärtet werden.

4.1.2 Surfactant-Lipide

Surfactant-Lipide werden in Typ-II-Zellen synthetisiert, von intrazellulären Strukturen hoher Dichte (Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat) zu solchen niedrigerer Dichte (Vesikel, Lamellarkörper) transportiert und per Exozytose in das Alveolarlumen abgegeben [15, 115]. Den größten Anteil haben die Phospholipide und unter diesen das Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC, Tab. 1). Monoschichten mit einem DPPC-Anteil von mehr als 90 % erreichen eine Stabilität, die derjenigen einer Alveole vergleichbar ist [48]. Deren beobachtete Oberflächenaktivität wurde daher den DPPC-Molekülen zugeschrieben.

Eine mit DPPC aufgefüllte Oberfläche hat eine sehr geringe Kompressibilität und widersteht damit einer Oberflächenverkleinerung, weil DPPC bei Körpertemperatur als feste Phase vorliegt [11]. Die sich spontan einstellende Gleichgewichts-Oberflächenspannung eines DPPC-Oberflächenfilms beträgt ungefähr 23 mNm^{-1} [26]. Eine Wechselwirkung zwischen DPPC und anderen Phospholipiden verursacht die Asymmetrie zwischen der sehr kleinen Halbwertzeit der Adsorption und der um Größenordnungen höheren Halbwertzeit der Desorption von DPPC. Die (bei pH 7) negativ geladenen Lipide Phosphatidylglycerol (PG) und Phosphatidylinositol (PI) fördern diese Adsorption von DPPC. Der Anteil

Tab. 1: Lipide im pulmonalen Surfactant

Lipidklasse	Komponente	Anteil [%]
Phospholipide	insgesamt	85
	PC, gesättigte FS*	50
	PC, ungesättigte FS	22
	PG	10
	PI, PE, PS	3
andere Lipide	neutrale Triglyzeride, Cholesterol	12

Gewichtsanteile getrennt nach Lipidklassen. Angabe in Prozent. Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylglycerol (PG) und Fettsäuren (FS). Nach [46]. *PC mit gesättigten Fettsäureresten tritt fast ausschließlich als DPPC auf (Dipalmitoylphosphatidylcholin).

von PG im Surfactant ist dabei im Vergleich zu anderen Geweben sehr hoch; PI kann PG im Surfactant funktionell ersetzen [16]. PC und PE liegen (bei pH 7) als Zwitterionen (amphoter) vor. Neutrallipide wie Cholesterol können wahrscheinlich nur in Anwesenheit von Phospholipiden und SP-A in die Oberfläche eingebaut werden und verschlechtern im allgemeinen die experimentelle Surfactant-Funktion [126]. Die Gesamtmenge an Phospholipiden (PL) in pulmonalem Surfactant beträgt ungefähr 10 mgkg^{-1} Körpergewicht (KG) [55]; die notwendige Menge zum Spreiten auf der Oberfläche aller Alveolen liegt im Bereich von 3 mgkg^{-1} KG [45].

4.1.3 Ultrastrukturen des pulmonalen Surfactants

Die wesentlichen Ultrastrukturen des pulmonalen Surfactants sind in Tab. 2 (S. 20) genannt. Die verschiedenen Ultrastrukturen besitzen unterschiedliche Oberflächenaktivitäten und umfassen intra- und extrazelluläre Strukturen, die im Stoffwechsel des pulmonalen Surfactants ineinander übergehen (Abb. 2, S. 22).

Die extrazelluläre Bereitstellung von Surfactant-Material für die Alveolar-Oberfläche kann durch unterschiedlichste Reize angeregt werden, insbesondere mechanische Dehnung von Typ-II-Zellen, adrenerge Signale und Fettsäure-Metaboliten [123]. Von den bekannten Ultrastrukturen sind hauptsächlich die Lamellarkörper und das tubuläre Myelin für die extrazelluläre Bereitstellung von oberflächenaktivem Surfactant-Material in der Alveole wichtig. Diese können sich auch spontan in vitro bilden, unter Energiezufuhr (beispielsweise Sonifikation) jedoch formieren sich oberflächenaktive Vesikel in vitro schneller und bleiben länger stabil [88]. Eine vergleichende Untersuchung der Oberflächenaktivität muß dabei zusätzlich die verschiedenen Vesikel morphologisch (beispielsweise elektronenmikroskopisch) identifizieren und klassifizieren, wobei die Bezeichnung der verschiedenen Ultrastrukturen nicht einheitlich ist [15, 69, 107].

Während der Einatmungsphase adsorbieren insgesamt ungefähr 500.000 Lamellarkörper, das sind 0.005 % des pulmonalen Phospholipidgehaltes, in den Oberflächenfilm der Gesamtzahl der Alveolen, der beim Erwachsenen $\approx 120 \text{ m}^2$ groß ist [46]. Aus der Oberfläche wieder ausgeschiedenes Material kann wahrscheinlich nur zu einem geringen Teil unmittelbar wieder adsorbieren, die Aufnahme in tubuläres Myelin oder in eine Typ-II-Zelle ermöglicht jedoch seine indirekte Wiederverwendung [39]. Der größte Teil des Surfactantgehaltes wird dabei in Alveolen retiniert und unterliegt diesem intraalveolären Stoffwechsel, lediglich 10 % werden von Alveolar-Makrophagen aufgenommen und abgebaut.

Tab. 2: Ultrastrukturen des pulmonalen Surfactants: Inhaltsstoffe, Morphologie, Vorkommen und Oberflächenaktivität

Ultrastrukturen	univesikuläres Körperchen	multilamellarer Körper	Lamellar-körper	tubuläres Myelin
Inhaltsstoffe				
SP-A	(+)	+	(+)	++
SP-B	(+)	+	+	(+)
SP-C	(+)	+	+	
Phospholipide	+ (unge-sättigte FS)	(+)	++	+ (PC und PG/PI)
Kalzium				++
Morphologie				
Geometrie	rund	oval	Lamellen	Gitter
Größe			≈1 μm	
Vorkommen				
Stoffwechselstufe	Abbauvorstufe	Transport-vesikel	Sekretions-vorstufe	Adsorptions-vorstufe
Zahl pro Zelle			100	–
Extrazellulär	+		+	++
Oberflächen-aktivität	–/(+)	–	+	++
Referenz	[120]	[36, 120]	[72]	[46, 113]

Übersicht über die Inhaltsstoffe (Proteine, Lipide und Kalzium), die elektronenmikroskopische Morphologie, das Vorkommen und die funktionelle Bedeutung hinsichtlich der Oberflächenaktivität der verschiedenen Ultrastrukturen des pulmonalen Surfactants.

Legende: – nicht vorhanden, (+) gering nachweisbar, + vorhanden, ++ wesentlich.

4.2 Biophysikalische Wirkungsweise von Surfactant in Alveolen

Zur Erklärung der biophysikalischen Wirkung von pulmonalem Surfactant gehen derzeitige Modellvorstellungen davon aus, daß in Alveolen eine wäßrige Subphase dem Alveolarepithel aufliegt und darauf wiederum eine wesentlich dünnere Oberfläche aus hydrophobem Material schwimmt. Pattle nahm im wesentlichen an, daß nur unlösliche Proteine diese Grenzschicht bilden [74], die bei geringem Luftgehalt der Lunge und Alveolen zu einer festen Auskleidung der Alveole werden und deren Kollaps verhindern sollte.

Clements erweiterte dieses Modell um die Beschreibung der Alveolenfunktion während der Atmungszyklen [23]. Demnach ist die Grenzschicht zu jeder Atemlage mit einem Film aus Phospholipiden vollständig aufgefüllt und bedeckt. Die

geringe Packungsdichte der Moleküle während der Inspiration, bei vergrößerter Grenzfläche, verursacht eine weitere Adsorption. Nach einer Expiration ist die Packungsdichte am höchsten und die Oberflächenspannung am geringsten.

Im einem Modell von Scarpelli erstreckt sich der funktionstragende Phospholipidfilm nicht nur über die Alveolenoberfläche, sondern auch über den luftleitenden Einlaß der Alveole [95]. Der Gasaustausch geschieht durch Diffusion durch den vollständig kugelförmigen Grenzflächenfilm, der im Bereich des Alveolen-Einlaß eine membranartige Doppelschicht bildet.

Bangham geht davon aus, daß der Phospholipidfilm bei geringem Luftgehalt der Alveolen eine solide Materialschicht bildet und die Alveolen vollständig auskleidet und stabilisiert [10]. Eine Vergrößerung der Grenzfläche führt dazu, daß der Film aufreißt und Inseln des Phospholipidfilms die Grenzfläche nur unvollständig bedecken; dieser diskontinuierliche Zustand der Grenzfläche kann nicht durch Messungen der Oberflächenspannung beschrieben werden. Die konkrete Beschaffenheit oder Zusammensetzung der Oberfläche ist allerdings in allen vorgestellten Modellen noch unbekannt.

4.3 Biophysikalische Eigenschaften pulmonalen Surfactants und seine Funktionen in der Lunge

Die als klassisch bezeichneten biophysikalischen Surfactant-Funktionen umfassen im wesentlichen die Verhinderung eines Alveolenkollaps bei niedrigem Lungenvolumen, die Verhinderung eines intraalveolären Ödems, die Herabsetzung des aufzubringenden alveolären Eröffnungsdrucks und die Erhaltung einer 'sauberen' alveolären Grenzfläche zur Luft [74]. Diese Funktionen erfüllt alveolärer Surfactant in Wechselwirkung mit den anatomischen Strukturen der Lunge, insbesondere mit der Geometrie der bis zu 200 μm durchmessenden Alveolen (Abb. 2, S. 22). Deren Alveolarsepten befinden sich zwischen den umgebenden Ausläufern des Bindegewebes, das die Rückstellkraft der Lunge vermittelt, und den elastischen Ringen der Öffnung der Alveolen zum Ductus alveolaris [122].

Diese Septen verlaufen entlang dem septalen Fasersystem; sie sind in flüssigkeitsgefüllten Lungen überlang und daher locker gefaltet. Wenn die Septen jedoch von Surfactant ausgekleidet sind, führt die Verkleinerung der Oberfläche zur Aufspannung der Septen innerhalb des Fasersystems, wodurch die Oberflächenspannung und damit die freie Energie minimiert wird. In der Alveole wirkt damit die Oberflächenspannung als zusätzliche kontraktile Kraft [97].

Der pulmonale Surfactant zeigt als wesentliche Eigenschaft eine Änderung der Oberflächenspannung in Abhängigkeit von der Größe der Oberfläche. Die Größe

der alveolären Oberfläche wird dabei durch den Atemzyklus bestimmt. Durch die Oberflächenvergrößerung während einer Inspiration können verschiedene Phospholipide, insbesondere solche mit ungesättigten Fettsäureresten, in den Oberflächenfilm adsorbieren. Die Funktion dieser Moleküle ist im wesentlichen die Beschleunigung der Adsorption von DPPC (mit gesättigten Fettsäureresten), das alleine nur sehr langsam in den Oberflächenfilm eingebaut wird. Die Oberflächenspannung kann dabei vorübergehend höher sein als im Adsorptionsgleichgewicht nach der Adsorption von DPPC [15]. Die Wechselwirkung zwischen DPPC und den anderen Phospholipiden beruht auf den gering unterschiedlichen Gleichgewichts-Oberflächenspannungen (ungefähr 23 bis 30 mNm^{-1}) zum Verlassen der Oberfläche und Eintreten in die Oberfläche. Dieser Adsorptionsmechanismus tritt während normaler Atemzyklen ('tidal breathing') auf, also ohne maximale Inspiration [103]; es ist dabei unklar, ob höhere Oberflächenspannungen (über 30 mNm^{-1}) in der Lunge überhaupt vorkommen können.

Durch die Ausatmung während normaler Atemzyklen wird der adsorbierte und zunächst relativ ungeordnete Oberflächenfilm wiederholt komprimiert. Der entstehende Filmdruck fördert dabei den Ausschluß weniger oberflächenaktiver Moleküle und eine höhere Ordnungsstufe der verbleibenden Moleküle. In der

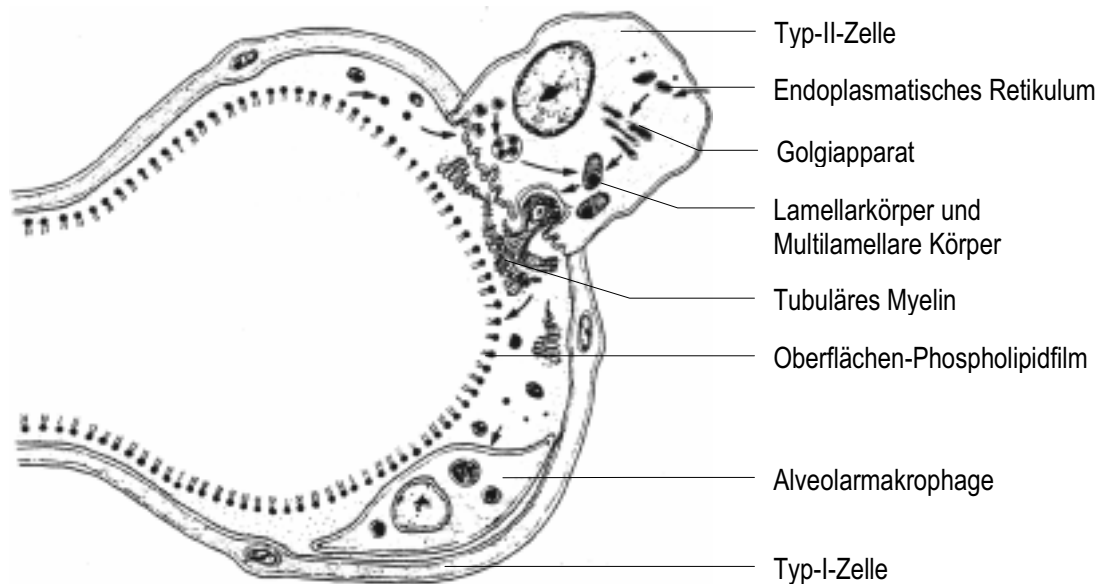


Abb. 2: Alveole und Surfactant

Schemazeichnung einer Alveole mit einer Typ-II- und Typ-I-Zelle sowie einem Alveolarmakrophagen. Durch Pfeile dargestellt wird der Stoffwechselweg des pulmonalen Surfactants von der intrazellulären Synthese (Endoplasmatisches Retikulum und Golgiapparat) und dem intrazellulärem Umbau (Multilamellare Körper und Lamellarkörper) über die Sekretion und den extrazellulären Umbau (Tubuläres Myelin) sowie die Entfaltung der biophysikalischen Oberflächenaktivität (Oberflächen-Phospholipidfilm) bis zum Ausschluß aus dem Oberflächenfilm und dem Abbau nach Wiederaufnahme (Alveolarmakrophage). Modifiziert, aus [46].

Expiration wird dadurch DPPC relativ angereichert. Der hohe Widerstand der verbleibenden DPPC-Monoschicht gegen weitere Kompression zeigt sich als Senkung der Oberflächenspannung auf Werte gegen null. Zu den Lipiden, die geringer kompressibel als DPPC sind und daher aus dem Oberflächenfilm herausgepreßt werden, gehören Lipide mit ungesättigten Fettsäureresten und andere aufgrund eines niedrigeren Schmelzpunktes flüssigere Lipide [39, 73].

Mit der Verringerung des Lungenvolumens während der Expiration geht eine Erniedrigung der Oberflächenspannung einher. Für diese Phase beruht die Stabilisation der alveolären Geometrie auf der Wirkung des Surfactant. Schürch beurteilt die biophysikalische Surfactant-Aktivität nach dieser Größe der verbliebenen Oberfläche, die durch den Surfactant stabilisiert wird [105]. Für Lungenvolumina oberhalb der Atemmittellage ist diese Surfactant-Funktion insofern weniger relevant, als in diesen Bereichen eine weitere Vergrößerung der Alveolen durch bindegewebige Strukturen begrenzt wird: Eine Lungendehnung würde aufgrund des Laplace-Gesetzes (S. 8) durch zunehmend geringere Druckerhöhung möglich sein und muß von einer entsprechenden Gewebekraft begrenzt werden.

Die Gleichmäßigkeit der Oberflächenspannungs-Senkung in der Lunge ist noch nicht bekannt: Einerseits wurde eine inhomogene Surfactant-Verteilung gefunden [9], die in verschiedenen Alveolen die Oberflächenspannung unterschiedlich reguliert, andererseits wurde dieselbe Oberflächenspannung in verschiedenen Alveolen nachgewiesen [97]. In einer einzelnen Alveole ist Surfactant jedenfalls nicht gleichmäßig verteilt und aktiv [14].

Für unterschiedliche Atemlagen ergeben sich aus der dynamischen Anpassung der Surfactant-Bedeckung an die Gewebestrukturen verschiedene Oberflächenspannungen: Bei einer mittleren Inspirationslage ist die Oberflächenspannung ungefähr 15 mNm^{-1} ; die Alveolarwände und die darin eingebetteten Kapillaren erscheinen glatt und der Surfactant ist auf dem gesamten Epithel verteilt [97]. Bei Expirationslage ist die Oberflächenspannung minimal ($<5 \text{ mNm}^{-1}$), die Kapillaren wölben sich stark in das Alveolarlumen vor und die kugelartige Alveolarwand wird dadurch eingebuchtet. Die in den Buchten auftretenden Kapillarkräfte (p_k , S. 8) sind wegen des minimalen Radius, der an der fast eckig eintretenden Kapillare auftritt, sehr groß. Die Kapillarkräfte führen dennoch nicht zum Kollaps der Alveole, weil sich in diesen Buchten Surfactant anreichert und dessen gegen null gehende Oberflächenspannung die Kapillarkräfte effektiv kompensiert [9].

Die Wechselwirkung zwischen der Geometrie der Alveole und dem Surfactant verhindert auch ein intraalveoläres Ödem: Die Alveole hat in situ keine kugelige Geometrie, sondern besitzt als Polyeder bindegewebige Flächen und Kanten.

Kanten können auch durch die starke seitliche Rundung kapillarer Erythrozyten aufgeworfen werden [49]. Im Verlauf dieser konkaven Kanten wird zwar Flüssigkeit auf der Epithelseite der Alveole angesammelt, aber die ausgedehnten Polyeder-Flächen können aufgrund ihrer höheren Oberflächenspannung nicht von Ödem-Flüssigkeit benetzt werden. Die Nettowirkung von großer Fläche (R groß, p_k klein, S. 8) und kurzer Kante (R klein, p_k groß) verhindert ein Ödem. Erst durch starke Erhöhung des intrakapillaren hydrostatischen Drucks (p_k groß) wird das alveoläre Polyeder kugelartig (R klein) von Flüssigkeit angefüllt [7].

In den Luftwegen verhält sich Surfactant wie auf einer ebenen Fläche und seine Spreitung wird zusätzlich durch die lateral unterschiedlichen Oberflächenspannungen gefördert (Marangoni-Effekt, S. 10). Durch Surfactant wird sowohl der Eröffnungsdruck reduziert [71] als auch die Entfernung obstruierender Flüssigkeit in kleinen Luftwegen ermöglicht [33]. Partikel in Atemwegen (5–50 μm Größe) können von spreitendem Surfactant überzogen und dadurch in der wässrigen Subphase gelöst (suspendiert) werden, wodurch der Abtransport durch Zilien-Bewegung und Aufnahme durch Makrophagen wesentlich gefördert wird [35].

Eine weitere klassische Surfactant-Wirkung ist die Minderung des notwendigen transthorakalen Drucks auf ungefähr 5 cm $\text{H}_2\text{O} \approx 0.5$ kPa zur Erhaltung der funktionellen Residualkapazität. Unter maschineller Beatmung ließ sich weiterhin eine Steigerung der passiven Dehnbarkeit (statischen Compliance) und maximalen Compliance der Lunge durch Surfactant zeigen; die dynamische Compliance nahm dadurch zu, daß die Druck-Volumen-Kurve der Lunge bei niedrigeren Atemdrücken steiler verlief [40].

Die maximale biophysikalische Surfactantaktivität und minimale in vivo Oberflächenspannung wird von vielen Autoren vereinfachend mit der niedrigsten in vitro meßbaren Oberflächenspannung gleichgesetzt. Die Messung weiterer Parameter der Surfactantaktivität (Kap. 3.4) oder der maximalen Oberflächenspannung ist demgegenüber schwieriger und nur beschränkt interpretierbar. Mit neueren Methoden wurde eine maximale Oberflächenspannung von 30 mNm^{-1} in vivo beobachtet [103].

4.4 Veränderungen des endogenen Surfactants und Wirkungsweise exogenen Surfactants

Die klassische Surfactant-Funktion der biophysikalischen Oberflächenaktivität in der Alveole kann durch Erkrankungen der Lunge oder andere Veränderungen des Surfactants beeinträchtigt sein. Ein charakteristischer Surfactant-Mangelzustand ist für das Atemnotsyndrom (respiratory distress syndrome, RDS) des unreifen

Neugeborenen verantwortlich [4], aber auch bei anderen Lungenerkrankungen können quantitative und qualitative Surfactant-Störungen bestehen. Hierzu zählen verschiedene Formen von Pneumonien, Strahlenschäden, Sauerstoffschädigung, Asthma und das akute Lungenversagen (acute respiratory distress syndrome, ARDS) [56, 77]. Bei Patienten mit ARDS wird der Verlauf des Lungenversagens möglicherweise durch SP-A-Gen-Polymorphismen bestimmt [63].

Aus der therapeutischen Wirksamkeit exogenen Surfactants bei diesen Lungenerkrankungen wurden weitere Surfactant-Funktionen abgeleitet: Minderung der Ventilations-Perfusions-Fehlverteilung und Vergrößerung der funktionellen Residualkapazität. Zusätzliche Wirkungen von exogenem Surfactant unter maschineller Beatmung sind: bessere Oxygenation bei reduzierter Sauerstofftoxizität, verbesserte Lungenexpansion bei niedrigeren Atemwegsdrücken und vermindertem Barotrauma sowie geringere Kreislaufbelastung bei niedrigeren endexpiratorischen Überdrücken [50].

Die genaue Wirkungsweise von therapeutischem Surfactant ist nur teilweise bekannt. Eine unspezifische Surfactant-Inhibition konnte durch SP-A *in vitro* [25] aufgehoben werden; *in vivo* wurde eine SP-A-Verminderung bei ARDS gefunden [80] und eine günstige Wirkung einer SP-A-Ergänzung von therapeutischem Surfactant bei RDS beobachtet [44]. Ein SP-B-Mangel verursacht die kongenitale alveolare Proteinose, die aufgrund eines Atemnotsyndroms im Neugeborenenalter letal ist. Dabei kommt es aufgrund der Fehlsekretion von SP-A (und SP-C) zu einer Bildungsstörung für tubuläres Myelin [68]. Eine Antikörper-Blockade von SP-B führte im Kaninchenmodell zum respiratorischen Versagen [92], während eine SP-B-Supplementierung positiv mit der Compliance unter Beatmung korrelierte [65]. Diese Funktionsstörungen entsprechen tierexperimentellen Befunden bei Mäusen mit abgeschalteten Genen für Surfactant-Proteine. Eine SP-A-Abschaltung verursacht wiederholte Pneumonien [52], während eine SP-B-Abschaltung zum Tod nach der Geburt führt [22].

Die Surfactant-Funktion wird auch durch Gerinnungsproteine, insbesondere Fibrin-Monomere, bei intraalveolärem Ödem spezifisch aufgehoben und kann durch SP-B und SP-C konzentrationsabhängig wiederhergestellt werden [106]. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde den Phospholipiden eines therapeutischen Surfactants ein synthetisches Analogon des SP-B zugesetzt und im Tierexperiment damit eine lebensrettende Oberflächenaktivität erreicht [24].

Eine Störung der Oberflächenaktivität von pulmonalem Surfactant kann auch bei Infektionskrankheiten der Lunge auftreten [79]. Unterschiedliche Pathogene lösen eine Entzündungsreaktion aus, die zunächst mit einem alveoloseptalen und

dann mit einem intraalveolären Ödem einhergeht. Auch aspiriertes Mekonium, insbesondere dessen hydrophobe Lipide, kann Surfactant *in vitro* und *in vivo* inhibieren [112]. Durch eine starke chemisch-physikalische Einwirkung wird der Surfactant geschädigt: Eine Lipidoxidation vermindert die Senkung der Oberflächenspannung [37]; extrazelluläre pH-Werte von über 7.4 behindern exogenen, nicht aber natürlichen Surfactant [41]. Temperaturen von über 40 °C können SP-A denaturieren [47]. Sie gehen zusätzlich mit einem erhöhten alveolären Verlust von DPPC einher, der durch Beatmung mit intermittierenden Seufzern allerdings reduziert wird [62].

Therapeutische Surfactant-Dosen von 25 bis 200 mgkg⁻¹ KG (Phospholipidgehalt) werden als Bolus-Substitution appliziert. Eine Funktionsverbesserung (gemessen an den Parametern Oxygenation, CO₂-Retention, Inzidenz bronchopulmonaler Dysplasie und Mortalität) wird auch von der Lavagierung der Lunge mit einer verdünnten Surfactant-Lösung (5–10 mgml⁻¹ Phospholipidgehalt) und von einer Surfactant-Verneblung erwartet [45].

4.5 Stand der Forschung in Hinblick auf die Messung biophysikalischer Eigenschaften mit dem Captive-Bubble-Surfactometer

Um die Oberflächenaktivität von pulmonalem Surfactant zu charakterisieren, wird derzeit das Captive-Bubble-Surfactometer als neuartiges Meßverfahren favorisiert, das weltweit aber lediglich drei Arbeitsgruppen zur Verfügung steht. Der wesentliche Vorteil dieses Verfahrens ist die vollständig geschlossene und unbeeinträchtigte Oberfläche, die im Gegensatz zu den meisten anderen Methoden eine verlustfreie Untersuchung oberflächenaktiven Materials ermöglicht (Kap. 3.5).

Nach der Erstbeschreibung dieses Captive-Bubble-Surfactometers durch Schürch [101] wurde zunächst nachgewiesen, daß die damit bestimmten Oberflächenspannungs-Oberflächen-Isothermen mit denen der Wilhelmy-Plattenmethode übereinstimmen [84] und bestimmte Meßwerte der Oberflächenspannung denen des Pulsierende-Blase-Surfactometers entsprechen [85].

Das Captive-Bubble-Surfactometer wurde zwar als *in vitro*-Modell alveolärer Vorgänge konzipiert [99], entspricht jedoch nach neueren Befunden nur bedingt der tatsächlichen Situation in Alveolen der Lunge [78]. Die besonderen Berechnungsvorschriften für Oberflächenspannungen [96] und Eichungen mit unterschiedlichen Referenzen [84] wurden vorgestellt.

Zur Zeit existieren weltweit insgesamt drei Captive-Bubble-Surfactometer neben dem in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Meßgerät: Verschiedene Modelle wurden von Prof. Schürch (Calgary, Kanada) und seiner Arbeitsgruppe entwickelt

und jeweils ein weiteres Meßgerät wird von den Arbeitsgruppen bei Prof. Goerke (San Francisco, USA) und Dr. Putz (Innsbruck, Österreich) eingesetzt. Mit Hilfe dieser Instrumente wurden bekannte Eigenschaften eines therapeutischen Surfactants [98] und von DPPC [101] reproduziert und bestätigt.

Neue Befunde wurden für natürlichen Surfactant aus Rattenlungen-Lavagen erhoben, dessen anhaltend hohe Stabilität [85, 100] und biophysikalische Oberflächenaktivität für unterschiedliche Konzentrierungen des oberflächenaktiven Materials differenziert wurde [83]. Surfactants aus Rinder- und Kaninchenlungen zeigten unterschiedliche Oberflächenaktivität [101]. Die Stabilisierung einer unterschiedlich großen Oberfläche unter Oberflächenkompression konnte für natürliche und künstliche Surfactants dargestellt werden [98].

In Experimenten mit Surfactants aus Phospholipiden wurde durch Zugabe von SP-A die Adsorption gesteigert und eine niedrige Oberflächenspannung nach wenigen Oberflächen-Kompressionen erreicht [104]. Durch SP-B und SP-C konnte ebenfalls die Adsorption verbessert und zusätzlich der Materialausschluß unter Kompression verringert werden [86].

Das Captive-Bubble-Surfactometer ermöglichte auch die erstmalige Beschreibung eines mehrschichtigen, oberflächen-assoziierten Surfactant-Reservoirs, dessen Bedeutung allerdings noch nicht völlig bekannt ist [102]. Dabei wurde ausgenutzt, daß die Subphase in dieser Apparatur während des Versuchs austauschbar ist.

Mit Hilfe des Captive-Bubble-Surfactometers wurden präzise und neue Erkenntnisse über biophysikalische Eigenschaften pulmonaler Surfactants in relativ kurzer Zeit und mit einem überschaubaren methodischen Aufwand gewonnen. Das Captive-Bubble-Surfactometer wurde hauptsächlich aus diesen Gründen für die vorliegende Untersuchung von pulmonalem Surfactant ausgewählt und eingesetzt. Darüber hinaus weisen andere Untersuchungsmethoden gerade bei diesem Material und ähnlichen, stark oberflächenaktiven Substanzen solche methodischen Nachteile auf, die ihre Durchführbarkeit (Pulsierende-Blase-Surfactometer) oder Aussagekraft (Wilhelmy-Plattenmethode) beeinträchtigen (Kap. 3.5).

Zusätzlich gibt es nur wenige Erfahrungen in der Anwendung spezieller Methoden der physikalischen Chemie (beispielsweise Pendant Drop, Kap. 3.5) auf pulmonalen Surfactant und daher ist noch nicht bekannt, ob diese dem Captive-Bubble-Surfactometer überlegen sind [84]. Im folgenden werden die Ziele der vorliegenden Arbeit für den Aufbau und Einsatz des eigenen Captive-Bubble-Surfactometers dargestellt.

5 Ziele dieser Untersuchung

Die Messung der biophysikalischen Oberflächenaktivität von pulmonalem Surfactant und anderen oberflächenaktiven Stoffen mit dem Captive-Bubble-Surfactometer stellt derzeit eines der methodisch präzisesten Verfahren dar, daß aber bisher weltweit nur drei Arbeitsgruppen zur Verfügung steht.

Die Ziele der vorliegenden Untersuchung umfassen daher:

- (a) den Aufbau eines eigenen Captive-Bubble-Surfactometers,
- (b) dessen Einsatz zur Testung biophysikalischer Oberflächenaktivität von wasserlöslichem und künstlichen unlöslichen Surfactants sowie
- (c) die Messung der biophysikalischen und chemischen Veränderungen von natürlichem pulmonalem Surfactant während einer Silica-induzierten Lungenschädigung im Tiermodell.

Der Aufbau des eigenen Captive-Bubble-Surfactometers nach einer eigenen Konzeption wird in Kapitel 6 und dessen Einsatz zur Testung der biophysikalischen Oberflächenaktivität unterschiedlicher Surfactants in Kapitel 8 dargestellt. Diese Einteilung wurde vorgenommen, um die aufbautechnischen Aspekte von den meßtechnischen Ergebnissen zu trennen. Die Arbeitsthese, die im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen waren und die Ziele konkretisieren, beinhalten:

- I. Das hier beschriebene und konstruierte Captive-Bubble-Surfactometer kann eine flottierende Luftblase in einer Testflüssigkeit erzeugen, temperieren, komprimieren und expandieren, abbilden und vermessen. Dieses meßtechnische Verfahren ist reproduzierbar.
- II. Diese Meßmethode bestimmt die Oberflächenspannung eines Oberflächenfilms einer Luftblase zwischen einer flüssigen und einer gasförmigen Phase. Die Oberflächenspannung von Wasser ist 69 mNm^{-1} (37°C) und kann ein Kriterium für die Reinheit der Grenzfläche sein.
- III. Löslicher Surfactant (Ethanol in Wasser) zeigt eine nicht-lineare konzentrationsabhängige Senkung der Oberflächenspannung. Die Oberflächenspannung ist unabhängig von der Veränderung der Größe der Grenzfläche.
- IV. Unlösliche Surfactants (reiner DPPC-Surfactant, künstlicher, boviner Lipid-Extraktions-Surfactant und natürlicher Surfactant) können in verschiedenen Konzentrationen untersucht werden. Diese Surfactants können dazu in die Grenzfläche injiziert oder in der wäßrigen Subphase suspendiert werden.
- V. Unlösliche Surfactants senken die Oberflächenspannung durch Adsorption in die Grenzfläche und zeigen nur eine geringe Konzentrationsabhängigkeit.
- VI. Unlösliche Surfactants können unter quasi-statischen und dynamischen Bedingungen untersucht werden. Sie zeigen unterschiedliche Kompressions-

Expansions-Isothermen. Die Oberflächenspannung ist jeweils abhängig von der Größe der Grenzfläche. Die minimale Oberflächenspannung strebt gegen null, während die dazu notwendige Filmkompression unterschiedlich ist.

- VII. Aufeinanderfolgende Kompressions-Expansions-Isothermen unlöslicher Surfactants ändern ihren Verlauf und zeigen zunehmend niedrigere Oberflächenspannungen, kleinere Hysteresen und geringere Filmkompressionen.
- VIII. Die Silica-induzierte Lungenschädigung im Tiermodell verursacht eine zeitdauerabhängige Steigerung des Protein- und Lipidgehalts und eine Verschiebung der Phospholipidanteile in dem durch Lavage gewonnenen Surfactant, ohne daß die biophysikalische Aktivität dieses Surfactants beeinträchtigt ist.

6 Aufbau des Captive-Bubble-Surfactometers

6.1 Konzeption

Ein Captive-Bubble-Surfactometer besteht grundsätzlich aus den folgenden Bestandteilen: (I) zentrale Meßkammer eines Volumens von ungefähr 1 cm^3 für die Aufnahme der Probe und der Luftblase mit Halterung und Probenrührer, (II) Heizungssysteme, (III) Füllungssystem der Meßkammer und Drucksystem zur Steuerung der Oberfläche, und (IV) optisches Abbildungssystem zur Analyse und Dokumentation der Luftblasen. Die Konstruktion dieser Bestandteile unterscheidet sich allerdings zwischen den bestehenden (Kap. 4.5) und dem eigenen Captive-Bubble-Surfactometer (Abb. 5, S. 34).

Bei dem ersten Modell des Meßinstruments wurde die Luftblase in der Meßkammer noch von Steuerschläuchen penetriert und dadurch methodische Artefakte verursacht. In den Folgemodellen wurde als Meßkammer eine senkrecht stehende Spritze eingesetzt, in der sich eine nicht-penetrierte Luftblase innerhalb der Probe befand. Der Entwurf des eigenen Captive-Bubble-Surfactometers beruht hingegen auf einer rechteckigen Meßkammer, einer herkömmlichen Küvette aus Glas, die in einen rechteckigen Halteapparat, einen Kubus aus durchsichtigem Acrylglas, druckdicht eingespannt wird (Kap. 6.2.1). Die Vorteile der eigenen Konstruktion bestehen darin, daß durch die planen Flächen keine optischen Verzerrungen verursacht werden und diese einfacher zu verarbeiten sind. Die obere Begrenzung der Meßkammer wird durch eine vergleichbare, aus Agarose gegossene Schicht gebildet, die hier zusätzlich durch einen Formstempel eine definierte Form erhält.

Der Thermostat der anderen Instrumente kontrolliert die Temperatur eines Wasserbades, das um die Meßkammer herum konstruiert wurde. In dem vorliegenden Entwurf werden sowohl der Halteapparat als auch die Küvette durch elektrische Abwärme direkt temperiert. Dieser Aufbau ist zugleich einfacher und arbeitet mit geringerer Zeitverzögerung. In allen Entwürfen wird zur Steuerung des Thermostaten die Temperatur innerhalb der Probe gemessen (Kap. 6.2.2). Die Probe selbst wird durch ein Rührstäbchen durchmischt, das magnetisch von außen angetrieben wird und in anderen Modellen zusätzlich durch andere Magnete in der Schwebe gehalten wird.

Alle vorgestellten Captive-Bubble-Surfactometer beruhen auf einer druckgesteuerten Veränderung der Größe der Grenzfläche. Dabei wird die Luftblase durch einen einstellbaren Druck auf die umgebende Flüssigkeit komprimiert und ihr Oberflächenfilm entsprechend verkleinert. Das von anderen am häufigsten

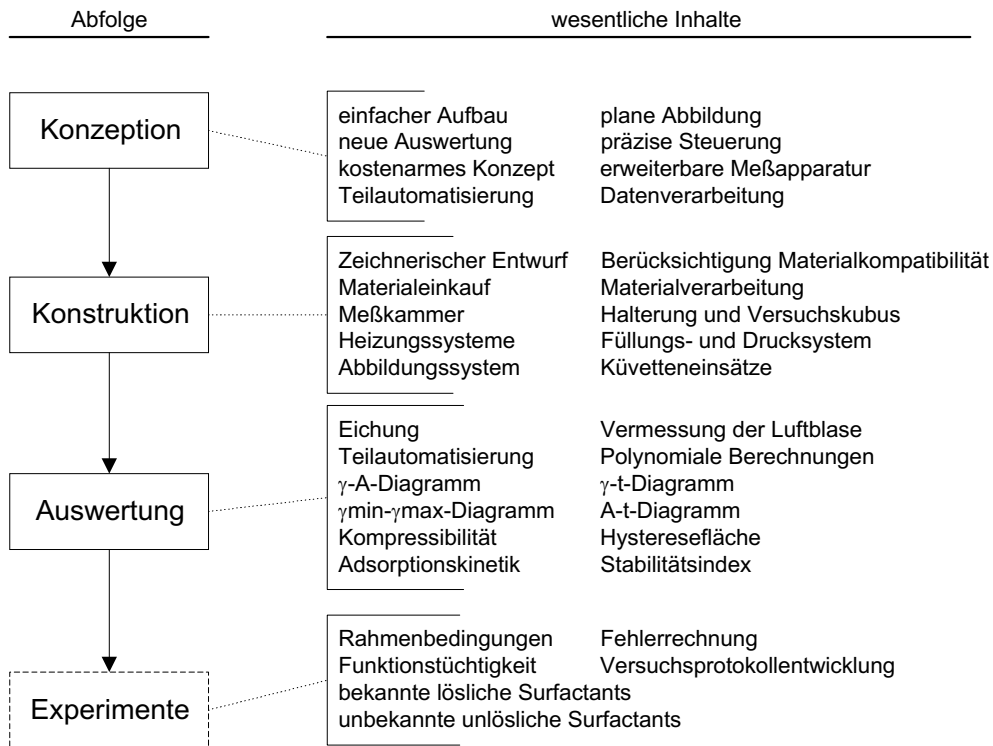


Abb. 3: Entwicklungsschritte des Captive-Bubble-Surfactometers

In der linken Spalte sind die inhaltlich und zeitlich aufeinanderfolgenden Schritte des Aufbaus des hier beschriebenen Captive-Bubble-Surfactometers aufgeführt. Die korrespondierenden Arbeitsinhalte sind rechts aufgezählt. Einige Arbeitsinhalte werden ausführlicher diskutiert (Kap. 6.1), während andere nur zur Vollständigkeit genannt sind. Das Ziel der Entwicklung war der experimentelle Einsatz des Captive-Bubble-Surfactometers (Kap. 7.8).

eingesetzte Modell verwendet dazu einen mechanischen Antrieb, mit dem die untere und obere Begrenzung der Meßkammer manuell zusammengedrückt werden. Die Meßkammer selbst kann nach der Befüllung mit der Probe dabei vollständig abgeschlossen bleiben. Die Drucksteuerung im eigenen Entwurf wird mit Inertgas (Helium) über ein Schlauchsystem vorgenommen, das durch ein Dichtgummi in die Meßkammer geführt wird. Dadurch ist eine automatisierbare und rasche Steuerung, aber auch das Auftreten von undichten Stellen möglich (Kap. 6.2.3). Die Befüllung der Meßkammer kann ebenfalls über das Schlauchsystem vorgenommen werden. Wenn die Meßkammer mit einer nicht oberflächenaktiven Lösung befüllt wird, kann das zu untersuchende oberflächenaktive Material auch direkt in die Grenzschicht eingespritzt werden.

Ein optisches Abbildungssystem zur Darstellung der Blase wird in allen Modellen verwendet. Die Geometrie der Blase wird dabei durch die Oberflächenspannung

bestimmt (S. 13). Neben dem hier eingesetzten Videosystem, das sich hauptsächlich durch seine hohe Auflösung auszeichnet (Kap. 6.2.4), wurden die absoluten Abmessungen von Blasen in anderen Instrumenten exemplarisch mit einem Kathetometer bestimmt.

Die Auswertung der Meßdaten ist ebenfalls ein Bestandteil der Entwicklung des eigenen Captive-Bubble-Surfactometers und schließt Bildanalysen, Formelrechnungen, Kurvenanpassungen, kinetische und grafische Auswertungen sowie statistische Tests ein, die zusammen mit anderen eingesetzten Methoden dargestellt werden (Kap. 7.2 und 7.11ff). Die wesentlichen Entwicklungsschritte beim Aufbau des eigenen Instruments werden in Abb. 3 (S. 31) wiedergegeben und werden im folgenden unter aufbautechnischen Aspekten beschrieben.

6.2 Konstruktion

In diesem Kapitel wird die Konstruktion des eigenen Captive-Bubble-Surfactometers beschrieben, wobei auf die einzelnen Bestandteile eines solchen Instruments eingegangen wird: Meßkammer und Halterung, Heizungssysteme, Füllungssystem, Drucksystem und Abbildungssystem.

6.2.1 Meßkammer und Halterung

Eine Küvette bildet die Meßkammer des Captive-Bubble-Surfactometers und wird in einem Kubus gehalten und abgedichtet. Diese Meßkammer ist zusammen mit der Videokamera auf einer Arbeitsplatte angebracht.*

Die Küvette (Nr. 601, Werkstätte für Chemie und Photo, Berlin) mit den Abmessungen 10 mm · 10 mm · 40 mm wird als Meßkammer für die Aufnahme der Proben verwendet und ist aus optischem Glas. Sie wird mit dem Boden zuoberst von unten in den Kubus eingeführt. Der seitliche Abstand zur entsprechenden Ausfräsung in dem Kubus als Halterung beträgt ungefähr 0.5 mm.

Die Ausbildung der eigentlichen Meßkammer innerhalb der Küvette erfordert den druckdichten Verschuß ihres Bodens durch eine flexible Dichtung, die gleichzeitig einen Durchtritt des Schlauchsystems ermöglicht, und die Ausformung eines Deckels aus Agarose, unter dem die Luftblase schwimmen soll.

Als Küvettendichtung wird dazu eine Scheibe aus Paragummi oder Silikonkautschuk (jeweils Gummi Wendt, Berlin) verwendet. In diese Scheibe werden Durchtrittstellen für das Schlauchsystem und einen Temperaturfühler gestanzt.

* Feinmechanische Ausführung: K. Dannenberg.

Diese Scheibe der Kuvettendichtung wird in eine flachere Haltescheibe eingelegt. Zwei Bohrungen in der Haltescheibe nehmen dabei zwei senkrecht im Kubus angebrachte Führungsstäbe auf. Die Kuvettendichtung kann dadurch nicht verdreht, sondern nur zusammengedrückt werden. Der druckdichte Verschluss der Kuvettendichtung erfolgt durch die 35 mm durchmessende Hohlschraube, die eine 13 mm messende, konzentrische Innenbohrung aufweist. Mit der Hohlschraube wird die Haltescheibe und damit die Kuvettendichtung druckdicht gegen die Kuvettenöffnung gepreßt.

Für die Ausformung des Agarose-Deckels wurde ein Formstempel an die Kuvette angepaßt (8 mm·9 mm·50 mm). Seine Vorderfläche ist konvex gewölbt, entsprechend einem Kugelsegment mit 350 mm Radius. Die Hohlschraube, der Formstempel für die Agarosefläche und die Haltescheibe wurden aus Delrin (Grünberg, Berlin) gefertigt, das geringer benetzbar und elektrostatisch als Teflon ist.

Ein Kuvetten-Einsatz trägt das ausgeschnittene Linienquadrat (4 mm·4 mm) einer mikroskopischen Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal (Werkstätte für Chemie und Photo, Berlin), das zur Eichung der Abbildung der Meßkammer eingesetzt und vermessen wird (Kap. 7.10). Ein in der Meßkammer verbleibender Einsatz trägt einen dünnen Glasspiegel, der gegenüber der Kamerablickrichtung um 45° nach hinten-unten gekippt ist und sich am Boden der Kuvette befindet. Durch diesen Spiegel wird zusätzlich zur horizontalen Seitenansicht eine senkrechte Aufsicht einer Blase ermöglicht. Diese Aufsicht wird zur Beurteilung der Rotationssymmetrie der Blase bezüglich einer senkrechten Drehachse verwendet.

Der Kubus als Halterung der Meßkammer ist aus durchsichtigem Acrylglas (Grünberg, Berlin) mit einer Kantenlänge von 100 mm und besteht aus zwei Hälften, die über Führungsschrauben exakt aneinander gesetzt werden (Abb. 4, S. 34). In der Mitte des Kubus befinden sich Ausfräsungen für die Kuvette und die Heizsysteme. Die vordere Seite des Würfels ist poliert und der Kamera zugewandt, seine hintere Seite mattiert und der Beleuchtung zugekehrt. Die Hinterseite des Kubus wird von einer Halogenlampe (25 und 50 W umschaltbar) durch eine elliptische Apertur beleuchtet.

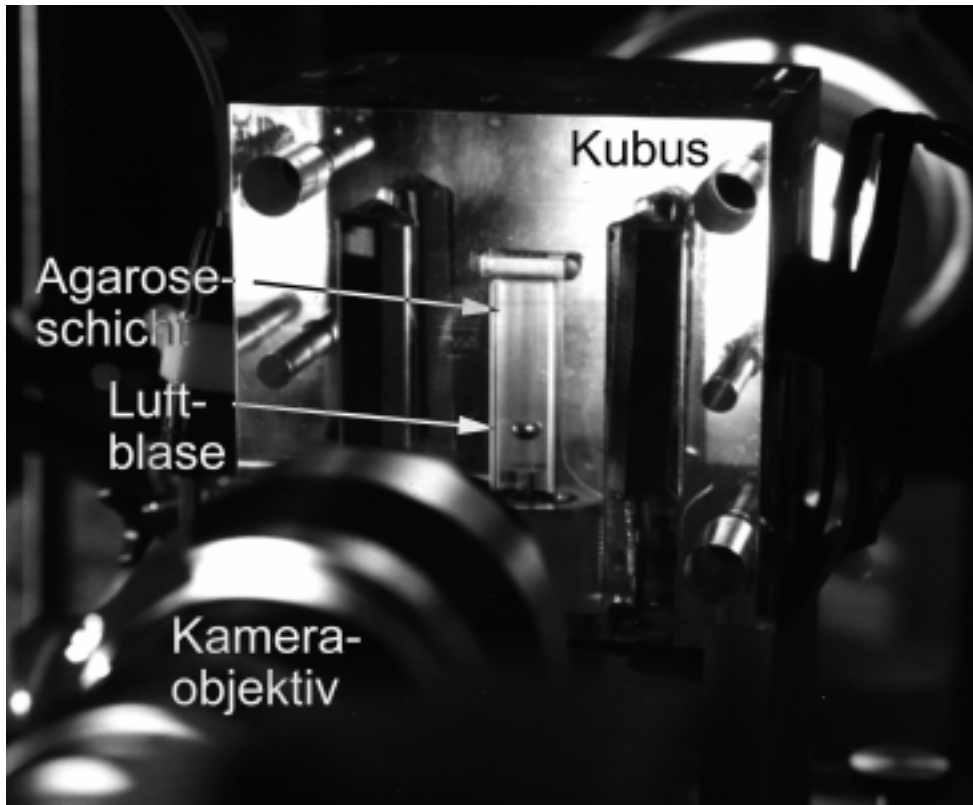


Abb. 4: Captive-Bubble-Surfactometer: Seitenansicht

Der Kubus während eines Experimentes. Blick über das Kameraobjektiv hinweg auf den Kubus im Durchlicht, die Küvette und die darin unterhalb der Agaroseschicht flutende Luftblase.

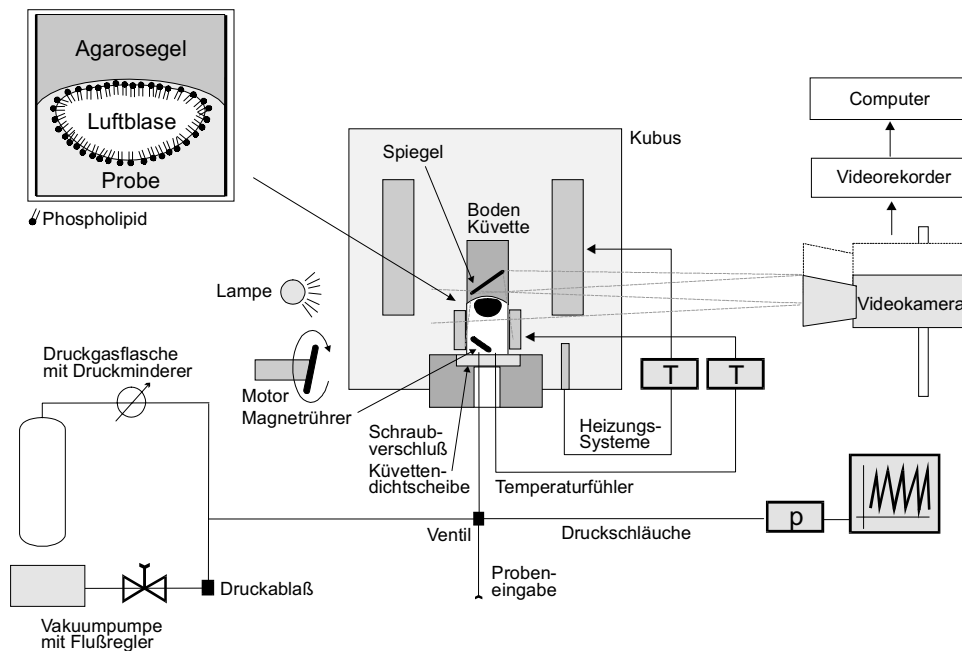


Abb. 5: Captive-Bubble-Surfactometer: Schemazeichnung

Schematische Darstellung der wesentlichen Komponenten des Captive-Bubble-Surfactometers zur Steuerung der Versuche und Messung der Oberflächenaktivität. Ausschnittsvergrößerung oben links: Ausgerichtete hydrophile und hydrophobe Anteile der Phospholipide in der Grenzfläche der Luftblase innerhalb einer Surfactant-Probe und unterhalb der Agaroseschicht.

Die Arbeitsfläche besteht aus einer Kunststoffplatte (25 cm·75 cm), auf der ein Schlitten in einem Langloch verschiebbar ist und den Kubus trägt. Ein Rührerantrieb ist an einer kleineren Halterung befestigt und bewegt einen großen Permanentmagneten drehzahlkontrolliert (80 Umin^{-1}) um seine kürzeste Achse. Die Arbeitsfläche lagert auf drei Schrauben, die eine Ausrichtung des Kubus und der Luftblase im Raum ermöglichen, und befindet sich wiederum auf einer vibrationsgedämpften, schweren Steinplatte des Labortisches.

6.2.2 Heizungssysteme

Die genaue Messung der Oberflächenspannung ist nur bei konstanter und bekannter Umgebungstemperatur möglich. Dazu wurden zwei unterschiedliche Heizungssysteme als Thermostaten an die Küvette und in den Kubus des Captive-Bubble-Surfactometers eingebaut. Das zunächst eingesetzte Heizungssystem I ermöglicht dabei die Heizung des Kubus durch die Abwärme von vier Ohmschen Widerständen (jeweils 4 W), die symmetrisch in den Kubus eingelassen und vergossen wurden. Der zugehörige Temperaturfühler befindet sich in Küvettennähe. Ein Stelltransformator und eine temperaturabhängige Relais-Schaltstufe ermöglichen jeweils die Einstellung der Heizleistung und Schaltung der Heizung.

Das weiterentwickelte Heizungssystem II regelt die Abwärme zweier Leistungstransistoren, deren Kühlkörper über eine Wärmeleitfolie links und rechts an die Küvettenwand gedrückt werden. Ein Temperaturfühler (NTC-Thermistor, Baugröße 0.47 mm Durchmesser, Philips-Valvo, Hamburg, Nr. 63302223) wurde in der abgeschliffenen Spitze einer Metallkanüle vergossen und durch eine Bohrung im Küvettenichtgummi in die Proben getaucht. Das elektronische Tastverhältnis (1:10 bis 1:1) bestimmt die Heizleistung der Leistungstransistoren, die temperaturabhängig durch zwei Schwellenschalter zwischen maximaler (35 W), reduzierter (20 W) und unterbrochener Leistungsabgabe umgeschaltet wird.* Die Istwert-Aufnahme der Temperatur-Fühler wurde durch Zweipunkteichung in Wasser bei 0 und 40 °C vorgenommen.

6.2.3 Füllungssystem und Drucksystem

Das Schlauchsystem wird zur Befüllung der Meßkammer verwendet und dient gleichzeitig der Einleitung des Steuerungsdrucks in die Meßkammer. Ein kleines Lumen wurde zur Reduzierung des Totvolumens gewählt und Polyethylen als Ausgangsmaterial verwendet, da dieses gegenüber Teflon und anderen Materialien

* Schaltungsvorschlag: K. Baehr.

weniger Inhaltsstoffe in das Lumen abgibt. Das küvettennahe Schlauchsystem wurde jeweils nur einmalig gebraucht und mögliche Inhaltsstoffe zuvor durch Ethanol herausgelöst. Dieses Polyethylen-Schlauchsystem hat einen Außendurchmesser von 2 mm (Werkstätte für Chemie und Photo, Berlin). Miniatur-Mehr-Wege-Ventile, T-Stücke, Absperrhähne und Fittinge bestehen aus Teflon (PTFE, bis 0.8 MPa druck- und heliumdicht, novodirect, Kehlheim). Eine Helium-Druckgasflasche (99.99 %, 10 l, AGA, Berlin) versorgt über einen Druckminderer (0.01–0.8 MPa, AGA, Bochum) das Schlauchsystem, das in die Probe und zu mehreren Austrittsstellen führt.

Eine Widerstand-Schlauchschleife (1 m Länge) zur Probe vermindert Druckspitzen durch Begrenzung des Gasflusses. Austrittsstellen ermöglichen eine verzögerungsfreie Druckregelung durch geringen, ständigen Gasfluß. Eine Vakuumpumpe (miniport, Dosch, Berlin) erzielt über eine Leistungssteuerung und ein Flußregulierendes Nadelventil einen Unterdruck von 0 bis 70 kPa. Die experimentelle Steuerung der Grenzflächengröße wird durch eine Drucksteuerung der Luftblase realisiert. Dazu werden Überdruck, Unterdruck und Umgebungsdruck durch elektromagnetische Ventile (SMC Solenoid Valve VZ 110, Berlin) umgeschaltet. Der Druck im Schlauchsystem wird 15 cm vor dem Schlaucheintritt in die Probe mit einem piezoresistiven und temperaturkompensierten Druckaufnehmer (GDH 14A, Auflösung 1 kPa, Greisinger electronic, Regenstauf) gemessen. Der Druckverlauf wird mit einem Papierschreiber (Econosystems, Biorad, München) in Abhängigkeit von der Zeit registriert.

6.2.4 Abbildungssystem

Die Bestimmung der Oberflächenspannung der Luftblase in der Meßkammer des Captive-Bubble-Surfactometers beruht auf der Auswertung der veränderlichen Geometrie dieser kugelförmigen Grenzfläche (Kap. 3.3). Dazu ist es notwendig, die Luftblase möglichst exakt abzubilden und zu vermessen. Ein Videosystem kann zusätzlich zur Dokumentation des ablaufenden Experimentes in Echtzeit benutzt werden, wobei die Auflösung dieser kleinen Distanz der durch optische Geräte (Kathetometer) erreichbaren unterlegen ist.

Die Vorderansicht des Captive-Bubble-Surfactometers wird durch eine Videokamera (DXC-151P, SONY, Köln) mit Zoom-Objektiv (18 bis 108 mm Brennweite, Lichtstärke 1:2.5, B18Z06Ma, SONY) aufgenommen. Die Kamera ist in Höhe und Neigungswinkel veränderbar. Ihr CCD-Sensor (16.9 mm Diagonale) hat 756 horizontale und 581 vertikale Bildpunkte, eine horizontale Auflösung von 460 Linien und bildet den Innenraum der Küvette (8 mm Breite) vergrößert ab.

Die Farbtemperatur der Kamera ist 3200 K, die Shuttergeschwindigkeit 1/250 s und die elektronische Verstärkung 6 dB. Das Kamerasignal (FBAS-Composite-Signal) wird durch den Videorekorder (Super-VHS-Standard, SVO-9620, SONY) mit digitaler Rauschunterdrückung (SVBK-150, SONY) und einer horizontalen Auflösung von über 400 Linien auf Magnetband (Maxell, Köln) aufgezeichnet. Die Wiedergabegeschwindigkeit ist variabel; jedes Einzelbild kann durch seinen Zeitcode (SVBK-160, SONY) identifiziert werden.

Ein Audiokanal mit einem Raummikrofon wird zur mündlichen und akustischen Dokumentation der Experimente verwendet. Das Ausgangssignal (FBAS-Composite-Signal) des Videorekorders wird gleichzeitig durch einen Computer-Bildschirm (CPD21sf, SONY) und einen Kontroll-Monitor (PVM-1443MD, SONY, Köln) angezeigt und innerhalb von 20 s von der Digitalisierungskarte (Kingfisher, Graphics Unlimited, Cambridge, England) des Computers (Apple Macintosh II fx, pandasoft, Berlin) in den Arbeitsspeicher geladen.

Die kleinste Informationseinheit dieses digitalisierten, zweidimensionalen Bildes wird als Pixel bezeichnet. Das digitalisierte Bild hat dabei eine Auflösung von 768·576 Videobildpixeln (PAL-Normgröße) und eine Farbtiefe von 256 Graustufen. Während der Bildanalyse unter Verwendung des Computer-Bildschirms entspricht ein Bildschirmpixel einem Videobildpixel.

Nach dieser Beschreibung der aufbautechnischen und konstruktiven Aspekte des eigenen Captive-Bubble-Surfactometers werden im folgenden Kapitel die benutzten Materialien und experimentellen Methoden dargestellt.

7 Materialien und Methoden

7.1 Lösungen und Substanzen

Vorratslösungen:

- 5 M NaCl (Merck, Darmstadt)
- 1 M TRIS (Sigma, St. Louis, USA)
- 0.1 M CaCl₂ (Merck)
- 0.1 M EDTA (Merck)
- 100% Ethanol zur Analyse (Merck)
- 100% Methanol LiChrosolv-Reagenz (Merck)
- 100% Chloroform HPLC-Reagenz (Baker, Phillipsburg, USA)

Standardpuffer für Probensuspension:

- 150 mM NaCl (Merck)
- 5 mM TRIS, pH 6.9 bei 37°C (Merck)
- 2.5 mM CaCl₂ (Merck)
- 0.5 mM EDTA (Merck)

Agarose:

- 1 % Agarose (Nr. 162-0100, Biorad, München)

Lösungen für die Phosphat-Bestimmung:

Extraktion: 0.9 % NaCl-Lösung, Methanol, Chloroform, Lösung C (Überstand einer Mischung aus 40 ml Chloroform, 40 ml Methanol, 36 ml 0.9 % NaCl-Lösung).

Phosphatbestimmung: 20 µgml⁻¹ Phosphor-Standard (Sigma, St. Louis, USA), konzentrierte Schwefelsäure, 30 % Wasserstoffperoxid-Lösung, 0.22 % Ammoniumheptamolybdat-Lösung, Fiske-Reagenz (0.5 g 1-Amino-2-naphtol-4-sulfonsäure lösen in 200 ml 15 % Natriumdisulfit-Lösung, 1 g Natriumsulfit hinzugeben, mischen, filtrieren).

Lösungen für die Proteinbestimmung:

Micro-Bichinonic-Acid-Assay (Pierce, Rockford, USA): Reagenz A: Natriumkarbonat, Natriumbikarbonat, 0.2 N NaOH; Reagenz B: 4 % (w/v) Bichinonsäure in Wasser; Reagenz C: 4 % (w/v) Kupfersulfatlösung.

Substanzen für die Silica-Instillation:

Anästhesie: Äther (Merck, Darmstadt).

Kristallines Silica, Partikelgröße 5 µm (Min-U-Sil, Berkeley, USA), sterilisiert.

Lösungen für die Lavage von Rattenlungen:

Anästhesie: 50 mg Nembutal-Pulver lösen in 1 ml 0.1 M Natriumbikarbonatpuffer, pH 9.6 bei 37 °C, dazu 700 IE Heparin geben.

Lungen-Perfusions- und Lavagepuffer: 150 mM NaCl und 5 mM TRIS, pH 6.9 bei 37 °C. Vor Gebrauch Lösung auf 37 °C erwärmen.

Oberflächenaktive Testsubstanzen

DPPC: L- α -Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin:
synthetisch, getrocknet, Herstellerangabe: Molgewicht 734 g, 99 % Reinheit, Lagerung bei -20 °C (Sigma).

Alveofact: Boviner Lipid-Extrakt-Surfactant (BLES):
50 mg Phospholipide und 5.4 mg NaCl in 1.2 ml wässriger Suspension, Lagerung bei 4 °C (Alveofact[®], Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach an der Riss). Herstellung aus Lavagen von Rinderlungen [17].

Exosurf: Künstlicher Surfactant (KS):
81 mg DPPC, 9 mg Hexadecanol, 6 mg Tyloxapol und 5.8 mg NaCl in 1 ml wässriger Emulsion, synthetisch. Lagerung bei 4 °C (Exosurf[®], Wellcome GmbH, Burgwedel).

Ethanol-Lösungen:

Ethanol: Volumenanteile 5, 10, 24, 48, 72 und 96 Prozent in Wasser.

7.2 Datenverarbeitung

Die Bildanalyse wurde mit Image 1.57 (National Institutes of Health, USA) und einem Mikrocomputer unter MacOS (Apple Macintosh II fx, pandasoft, Berlin) durchgeführt. Die Versuchsdokumentation und Berechnung von Oberflächenspannung, Oberfläche und Volumen der Luftblase aus deren Abmessungen wurde mit Excel 4.0 (Microsoft, Redmond, USA) vorgenommen.

Die Versuchsauswertungen erfolgten mit einem Mikrocomputer unter Windows (Microsoft) und den folgenden Programmen: SAS 6.11 (SAS Institute, Cary, USA), Mathematica 2.2.3 (Wolfram Research, Champaign, USA), Origin 2.94 (MicroCal, Northampton, USA), Excel 7.0 (Microsoft) sowie Prism 1.03 (Graph-Pad, San Diego, USA). Die Programmierung eigener Routinen zur Auswertung der Experimente (Kap. 7.13) umfaßt über 2700 Zeilen an Programmcode in SAS, Mathematica und Excel.

7.3 Tiermodell der Lungenschädigung*

7.3.1 Silica-Instillation

Weibliche Wistar-Ratten (Alter vier Wochen, Gewicht 275 g, Bundesgesundheitsamt Berlin) wurden eine Woche nach Käfigwechsel in Äther-Narkose mit einer Venenverweilkanüle (18 Gauge) tracheal intubiert. Eine frisch hergestellte und sterilisierte Silica-Suspension (10 mg Silica in 0.5 ml isotoner Kochsalzlösung) wurde vorsichtig über die Kanüle intratracheal injiziert. Kontrolltieren wurde 0.5 ml sterile isotone Kochsalz-Lösung intratracheal injiziert [29].

7.3.2 Lavage Rattenlunge

Ein Versuchstier wurde durch intraperitoneale Nembutal-Injektion narkotisiert und durch Schlitzung der Bauchaorta getötet. Der Brustkorb wurde eröffnet, die Trachea dargestellt und unter Sicht mit einer Plastikkanüle (18 Gauge) intubiert und einfach ligiert. Der Truncus pulmonalis wurde aufgesucht, kanüliert und das linke Herzohr eingeschnitten. Die Lunge wurde über den Truncus mit 25 ml Perfusionspuffer vorsichtig blutfrei perfundiert und währenddessen zehnmal mit jeweils 7–8 ml Luft (entsprechend dem Lungenvolumen) gebläht.

Die Lunge wurde entnommen, nach Exzision umgebender Strukturen das Feuchtgewicht bestimmt und 50 ml Lavagepuffer in Portionen von 8 ml instilliert. Das zurückfließende Lavageat wurde aliquotiert und nach Zentrifugation (300 g, 4 °C, 15 min, Beckmann Variofuge 3.0R) bei -70 °C tiefgefroren.

7.3.3 Aufarbeitung des Lavageats

Eine Teil des Lavageats (26.5 ml) wurde durch Zentrifugation konzentriert (27 kUpm, 4 °C, 60.000 g, 60 min, Rotor 50.2i, Beckman Ultrafuge). Der Überstand wurde dekantiert und bei -70 °C tiefgefroren. Das Sediment (bezeichnet als 60 k-Pellet [100]) wurde in Standardpuffer (350–4000 µl, entsprechend der erwarteten Phospholipidkonzentration) durch mehrfaches Anspülen resuspendiert, quantitativ in einen Homogenisator überführt und damit zwanzigfach passiert. Aliquots dieses Konzentrats wurden bei -70 °C für maximal sechs Monate tiefgefroren.

* Die Tierexperimente wurden vom Berliner Senat für Gesundheit genehmigt (TVV 31/90 und G 0292/93).

7.4 Chemische Bestimmungen

7.4.1 Extraktion von Lipiden

Ein Proben-Aliquot wurde in einem Glasröhrchen (16 mm·125 mm) mit NaCl-Lösung auf 1.6 ml aufgefüllt, dazu 4 ml Methanol gegeben und kräftig gemischt. Nach 10 min wurden 2 ml Chloroform hinzugegeben, gemischt und nach weiteren 10 min zentrifugiert (2000 Upm, Beckmann Variofuge 3.0R). Der Überstand des Proteinsediments wurde in einem neuen Röhrchen erneut mit 2 ml Chloroform und 2 ml NaCl-Lösung gemischt und entsprechend zentrifugiert. Nach Absaugen des wäßrigen Überstandes wurde die untere, organische Phase mit 2 ml Lösung C gemischt und zentrifugiert. Nach Absaugen des wäßrigen Überstandes wurde die Probe eingedampft [34].

7.4.2 Bestimmung der Phosphatkonzentration

Im Anschluß an die Lipid-Extraktion (Kap. 7.4.1) wurde die eingedampfte Probe mit 300 µl konzentrierter Schwefelsäure versetzt und inkubiert (Heizblock, 60 min, 180 °C). Nach Zugabe von 300 µl Wasserstoffperoxid wurde die Probe erneut inkubiert und nach Abkühlung 6 ml Ammoniumheptamolybdat-Lösung sowie 300 µl Fiske-Reagenz zugegeben. Nach Inkubation (Wasserbad, 20 min, 100 °C) und Abkühlung wurde die Extinktion der Probe photometrisch bei 825 nm gegen den Leerwert gemessen. Eine lineare Standardkurve von 1.25 bis 15 µg Phosphorgehalt pro 1.6 ml ermöglichte die Bestimmung der Phosphat-Konzentration der Probe [13].

7.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Reagenzien A, B und C (Kap. 7.1) wurden im Volumenverhältnis 50:48:2 gemischt davon 1 ml zu 1 ml der Probe gegeben. Nach Inkubation (Wasserbad, 60 min, 60 °C) und Abkühlung wird die Extinktion der Probe photometrisch bei 562 nm gegen Wasser gemessen. Mit Hilfe einer im Bereich von 1 bis 20 µgml⁻¹ linearen Eichkurve wurde die Proteinkonzentration der Probe errechnet [110].

7.5 Phospholipidspektrum-Analyse*

Zur Analyse des Phospholipidspektrums durch die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) wurden die Lipide einer Probe mit Chloroform-Methanol (1:1) extrahiert, gewaschen, eingedampft und in mobiler Phase gelöst. Die Phos-

* Entwicklung und Durchführung der HPLC: Dr. rer. nat. H. Bünger und R. Tschiersch.

pholipide wurden im Verlauf eines Gradienten der mobilen Phase nacheinander über die stationäre Phase (5 μm Silica, Encapharm 100, Molnar, Berlin) im Flüssigkeitschromatographen (HP-1090, Hewlett Packard, Waldbronn) eluiert. Das Eluat wurde vernebelt und im Lichtstredetektor (Sedex-45, Sedere, Frankreich) die von der Molekülgröße und -konzentration abhängige Streulichtintensität gemessen. Es konnten bis zu neun verschiedene Phospholipidklassen getrennt werden, deren Wiederfindungsrate 0.81–1.13 war [20].

7.6 Reinigung von Geräten

Zur Messung der biophysikalischen Oberflächenaktivität mit dem Captive-Bubble-Surfactometer wurden ausschließlich Glasgeräte eingesetzt und solche Kunststoffe, die ebenfalls durch Behandlung mit Chloroform und Methanol oder Ethanol gereinigt werden konnten. Die Glasreinigung erfolgte dabei mit phosphatfreiem Waschmittel (Neodisher LM3, Weigert, Hamburg), einem Spülgang mit Chloroform-Methanol (1:1) und Methanol (100 %) sowie vier Spülgängen mit hochreinem Wasser ($>18 \text{ M}\Omega\text{m}$, Millipore) zur Elimination verbliebener Detergentien. Plastikteile wurden mit Ethanol (100 %) und mit hochreinem Wasser durchgespült und luftgetrocknet. Der Kubus wurde mit herkömmlichen Acrylglas-Pflegemittel gereinigt und poliert. Die Küvettendichtungen wurden nach dem Stanzen der Öffnungen manuell mit Waschmittel gereinigt, für mindestens eine Woche in Methanol (100 %) eingelegt, von Rückständen gereinigt und mit hochreinem Wasser gespült.

Agarose wurde zweimalig mit Chloroform-Methanol (1:1) extrahiert und unter Stickstoff getrocknet. Zur Herstellung einer benutzungsfertigen Küvette wurde der Formstempel in eine Küvette eingesetzt, die mit 3 ml ungefähr 50 °C heißer Agarose-Lösung befüllt war. Ein Teil der Agarose wurde dadurch aus der Küvette gedrückt. Die Oberfläche der verbleibenden Agarose nahm die Wölbung des Stempels an. Diese Küvette wurden einige Tage bei 4 °C gelagert.

7.7 Vorbereitung von Proben

Die Zubereitung, kurzzeitige Lagerung und Injektion der Proben vor Messungen im Captive-Bubble-Surfactometer wurde ausschließlich mit Glasgefäßen und Glasspritzen durchgeführt. Tiefgefrorene Proben wurden in Polypropylen-Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) aufbewahrt. Proben einer organischen DPPC-Lösung wurden mit einer kalibrierten Glasspritze (1 μl , Typ 7001 NCH, Nr. 80104/00, Hamilton, Schweiz) in die Grenzfläche injiziert. Das spezifische Gewicht wurde mit einem geeichten Pyknometer (Schott, Mainz) bei 20 °C be-

stimmt. Vorratslösungen und Standardpuffer wurden nach Zubereitung dampfsterilisiert und alle acht Wochen erneuert.

Unlösliche Surfactants wurden in Standardpuffer resuspendiert, während 5 min erwärmt (Wasserbad, 37 °C), 15 s durchmischt (Vortexer VF2, Janke, Berlin) und für 20 s in ein Ultraschallbad getaucht (Janke, Berlin). Anschließend wurden die Proben mit einer Wasserstrahlpumpe entgast und bis zum Einsatz (innerhalb von 30 min) verschlossen gehalten. Einige Experimente erfolgten durch Injektion einer DPPC-Lösung (2 mgml^{-1} DPPC in Methanol-Chloroform 1:1) in die Grenzfläche der Luftblase innerhalb der mit hochreinem Wasser gefüllten Meßkammer. Für alle Vorbereitungen an solchen Teilen des Captive-Bubble-Surfactometers, die Kontakt zu Proben haben, wurde hochreines Wasser verwendet.

7.8 Messungen der Oberflächenaktivität

Der Kubus des Captive-Bubble-Surfactometers wird mit einer Küvette beladen, ein Magnet-Rührstab (2 mm Länge, Werkstätte für Chemie und Photo, Berlin) eingelegt und die Meßkammer mit der Küvettendichtscheibe, der Haltescheibe und der Hohlschraube verschlossen. Die Leistungstransistoren werden gegen das Küvettenglas gedrückt. Der Temperatursensor und das Schlauchsystem werden in den Öffnungen der Küvettendichtscheibe und ein Drei-Wege-Hahn an der linken Kubuseite befestigt. Der Kubus wird umgedreht gelagert, so daß der Füllvorgang von vorne kontrolliert werden kann.

Die Spitze einer Kanüle (0.2 mm Außendurchmesser) wird dazu durch die Küvettendichtung in die oberste Ecke der Küvette vorgeschoben. Die Küvette wird vollständig befüllt und durch die Kanüle entlüftet. Der Drei-Wege-Hahn wird geschlossen und der Kubus in seine Halterung auf der Arbeitsfläche gebracht. Der U-Schenkel des Schlauchsystems zur Küvette ist dabei mit der Probe gefüllt und verhindert, daß zusätzliche Blasen durch Auftrieb aus dem Schlauchsystem in die Küvette übertreten.

Die Probe wird unter kontinuierlichem Rühren temperiert (37 °C) und unter Überdruck gehalten, um eventuell vorhandene Luftbläschen zu lösen. Der Kubus wird dann in die gleiche Lage wie zur Befüllung gebracht und der Überdruck abgelassen. Eine Glasspritze (50 µl, Hamilton) enthält ein bestimmtes Volumen an Raumluft, wird durch ein Führungsrohr in die oberste Ecke der Küvette vorgeschoben und damit zügig eine einzige Luftblase in die Probe injiziert. Der Kubus wird zurück in seine Halterung auf der Arbeitsfläche gebracht und die Video-Aufzeichnung des Experimentes gestartet.

In diesem Zustand flutet die Luftblase unter der Agarose in der Küvette. Die Blase kann dann durch Verstellen der Arbeitsfläche in der Küvette zentriert werden. Die Messungen der Oberflächenaktivität können unter diesen Bedingungen beginnen; die entsprechenden Versuchsabläufe werden im folgenden beschrieben.

7.9 Versuchsprotokolle

Der Versuchsablauf folgte vier unterschiedlichen Protokollen, die in Anlehnung an vorbeschriebene Arbeiten und nach eigenen Vorversuchen entwickelt wurden: Adsorption und Desorption einschließlich Stabilitätsmessungen, sowie Kompressions-Expansions-Zyklen unter quasi-statischen und dynamischen Bedingungen (Tab. 3, S. 46). Die Veränderung der Oberflächenspannung, der Oberfläche und des Volumens einer Luftblase wird durch eine gesteuerte Veränderung der Oberfläche gemessen. Die Steuerung des Versuchablaufs geschieht durch Einstellung des hydrostatischen Systemdrucks, der die Luftblase verkleinert oder vergrößert. Für jeden Versuch wird mindestens eine Datei angelegt, in der alle Meßwerte und Versuchsbedingungen dokumentiert werden (Formatierung des Dateinamens: xxxyyyyn.XLS mit Probenbezeichnung xxx, Datumsschlüssel yyyy und Wiederholung n). Jeder Versuch wurde mindestens einmalig wiederholt, die meisten Versuche jedoch dreimal oder häufiger durchgeführt.

7.9.1 Adsorption

Bei Adsorptionsmessungen wird eine Luftblase von 25 µl in die Probe injiziert und abrupt durch Unterdruck (-70 kPa) vergrößert. Die Messungen bestehen aus Einzelbild-Aufnahmen der abnehmenden Oberflächenspannung zu bestimmten Zeitpunkten über insgesamt 10 Minuten (Tab. 4, S. 46).

7.9.2 Stabilität

Die Stabilitätsmessungen werden im Anschluß an Kompressions-Expansions-Zyklen unter Beibehaltung eines konstanten Überdrucks (≈ 100 kPa) durchgeführt, der zwischen dem maximalen und minimalen Druck der vorangegangenen Zyklen liegt. Eine Veränderung der Oberflächenspannung wird anhand von Einzelbild-Aufnahmen zu bestimmten Zeitpunkten während insgesamt 30 Minuten gemessen (Tab. 4, S. 46).

7.9.3 Quasi-statische Kompressions-Expansions-Zyklen

Zyklen werden unter wiederholter Kompression und Expansion der Luftblase durchgeführt. Als quasi-statisch werden solche geringen und langsamen Druck-

veränderungen im Zusammenhang mit Untersuchungen biophysikalischer Oberflächeneigenschaften bezeichnet, währenddessen der Oberflächenfilm relaxieren kann und eine vernachlässigbar geringe kinetische Energie zugeführt wird. Ein Schritt der Druckerhöhung wird über mindestens 10 s vorgenommen. Gegen Ende der anschließenden Beobachtungsdauer von 20–50 s soll die Luftblase sich nicht mehr sichtbar verändern. Ein Zyklus umfaßt 10–30 Schritte, entsprechend 5–30 min, wobei jeweils eine Bestimmung der Oberflächenspannung durchgeführt wird (Tab. 6, S. 46). Ein Experiment ist auf ungefähr fünf Zyklen begrenzt, da im Verlauf die Blase an Volumen abnimmt und Luft in der Probe gelöst wird.

7.9.4 Dynamische Kompressions-Expansions-Zyklen

Für dynamische Zyklen wird der Steuerungsdruck zwischen einem bestimmten minimalen und maximalen Druck umgeschaltet. Das Zeitdauer-Verhältnis von Kompression zu Expansion (50:50) und die Zyklus-Frequenz (10 min^{-1}) wird durch das elektronisch kontrollierte Magnetventil vorgegeben. Als maximaler Druck ist derjenige Steuerdruck sinnvoll, ab dem in anderen Versuchen keine Veränderungen der Luftblase mehr zu beobachten waren. Die Messungen umfassen in jedem Zyklus die Bestimmung der Oberflächenspannung der maximal expandierten und komprimierten Luftblase, zusätzlich wurden in wenigen Zyklen die Meßpunkte wie bei quasi-statischen Zyklen ausgewertet (Tab. 4, S. 46). Das Experiment wird über 10 Minuten durchgeführt.

7.10 Eichung

Das Linienquadrat (4 mm·4 mm) einer mikroskopischen Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal (Werkstätte für Chemie und Photo, Berlin) wurde in einer Küvette befestigt. Die Eich-Küvette wird im Kubus mit Wasser befüllt. Die Kamerahalterung wird um die Objektivlängsachse geschwenkt und die Abbildung des Linienquadrats rechtwinklig ausgerichtet. Die Brennweite und der Fokus der Videokamera werden so eingestellt, daß die Seitenwände der Eich-Küvette abgebildet werden und das Linienquadrat sich in der Fokusebene befindet. Eine Veränderung von Kameraposition, Blende, Brennweite oder Fokus erfordern daher eine neue Eichung der Abbildung der Meßkammer. Das Bild der Eich-Küvette wird aufgezeichnet und digitalisiert. Die Pixelweite des Quadrats wird zehnfach an verschiedenen Stellen ausgemessen und zu getrennten Umrechnungsfaktoren für Breite und Höhe gemittelt.

Tab. 3: Allgemeine Übersicht über die verschiedenen Versuchsprotokolle

	V	p	t	Bemerkung
ADS	30 μ l	-70 kPa	5 min	Rührgeschwindigkeit erniedrigt
STAB	\approx 20 μ l*	100 kPa	30 min	teilweise nach QS durchgeführt
QS	30 μ l	\approx 300 kPa*	60 min	Druck manuell kontrolliert
DYN	30 μ l	\approx 200 kPa*	10 min	Druck elektronisch kontrolliert

Initiales Volumen der Luftblase (V) nach Injektion, Druckdifferenz (p) zur Steuerung der Oberflächenveränderung, ungefähre Versuchsdauer (t) und Bemerkungen zur Durchführung für die vier eingesetzten Versuchsprotokolle: Adsorptionsmessung (ADS), Stabilitätsmessung (STAB), quasi-statische Zyklen (QS) und dynamische Zyklen (DYN). Einige Versuchsbedingungen (*) sind abhängig von der eingesetzten Probe oder vorangegangenen Zyklen.

Tab. 4: Meßpunkte Versuchsprotokollen zur Adsorptions- und Stabilitätsmessung

n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
ADS [s]	0	1	5	10	15	20	30	40	50	60	90	120	180	240	300
STAB [min]	0	1	2	3	4	5	10	15	20	25	30				

Nummer des Meßpunktes (n) bei Adsorptionsmessung (ADS) in Sekunden nach Adsorptionsbeginn und bei Stabilitätsmessung (STAB) in Minuten nach Beginn des konstanten Steuerungsdrucks. Ein Meßpunkt umfaßt jeweils die Bestimmung von Oberflächenspannung, Oberfläche und Volumen bei minimaler und maximaler Blasengröße.

Tab. 5: Meßpunkte in quasi-statischen und dynamischen Versuchsprotokollen

n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
QS [Zyklus]	1	2	3	4	5									
DYN [Zyklus]	1	2	3*	4*	5	6*	7*	8*	9*	10	20*	30*	40*	50

Nummer des Meßpunktes (n) bei quasi-statischen (QS) und dynamische Zyklen (DYN). Ein Meßpunkt umfaßt jeweils 10 bis 30 Bestimmungen von Oberflächenspannung, Oberfläche und Volumen zwischen den Zeitpunkten der minimalen und maximalen Blasengröße. Ein gekennzeichnete Meßpunkt (*) umfaßt lediglich eine Bestimmung zum Zeitpunkt der minimalen und maximalen Blasengröße.

Tab. 6: Steuerungsdrücke in quasi-statischen Versuchsprotokollen

n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
p [100 kPa]	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.6	0.8	1	1.25	1.5	1.75	2	2.5	3

Steuerungsdrücke (p) des jeweiligen Meßpunktes (n) eines quasi-statischen Kompressionszyklus.

7.11 Vermessung der Luftblase

Zur Berechnung der Oberflächenspannung, der Oberfläche und des Volumens einer Luftblase während eines Versuches muß zunächst die Höhe und Breite der Luftblase in der Seitenansicht vermessen werden. Die Seitenansicht wird dazu mit der Videokamera gefilmt und in Graustufen digitalisiert (Abb. 6, S. 49). Mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms werden aus der Originalansicht für Höhe und Breite der Luftblase getrennt Schnittbilder errechnet, in denen die Grauwert-Dichte in Abhängigkeit von der Schnittstelle dargestellt wird und die größte Ausdehnung der Blase einschließen (Abb. 7, S. 49).

Die Begrenzung der Luftblase ist an den Stellen starker Grauwert-Veränderungen zu vermessen, wie durch die Pfeile in Abb. 7 (S. 49) angedeutet wird. Die Rotationssymmetrie der Luftblase bezüglich ihrer senkrechten Drehachse wird in der Aufsicht auf die Luftblase von oben und die Bestimmung des Verhältnisses von Tiefe und Durchmesser beurteilt. Dieses Verhältnis wird exemplarisch in einigen Versuchen bestimmt.

7.12 Berechnungen

Die Berechnungen der Oberflächenspannung, der Oberfläche und des Volumens beruhen auf zahlreichen von anderen simulierten Blasen [96]. Die Seitenansichten dieser Rotationskörper wurden in horizontale Schnitte zerlegt und aus deren Einzel-Oberfläche und Einzel-Volumen die Oberfläche und Volumen der Blasen numerisch bestimmt. Die Oberflächenspannung wurde aus den Seitenansichten der simulierten Blasen hingegen analytisch bestimmt, indem die Kurvenfunktionen der Blasen-Begrenzungen ermittelt wurden und die Oberflächenspannungen exakt mit Hilfe von Differentialgleichungen der Laplace-Beziehung für achsensymmetrische Tropfen berechnet wurden [61].

Ein Polynom G_r wurde dann als Korrekturglied für das Verhältnis der Oberflächenspannung einer hypothetischen, aber exakt berechenbaren semi-inifiniten Blase zu der gesuchten Oberflächenspannung der tatsächlich beobachteten Blase eingesetzt. Dieses Korrekturglied wurde dazu durch die Wahl der Parameter $c_0 = 1$ und $c_6 = -(c_1 + c_2 + c_3 + c_4 + c_5)$ durch die Extremwerte $G(0) = 1$ und $G(1) = 0$ der Korrektur der Oberflächenspannung gezwungen (vgl. Abb. 8, S. 50).

Ebenso wurden interpolierende polynomiale Kurvenanpassungen (Approximationen) der Termglieder A_r und V_r an das Verhältnis $r = h/d$ der Höhe h zu Durchmesser d der simulierten Blasen durchgeführt.

Die Koeffizienten c_i (Tab. 7) bestimmen diese Approximationen als sechstgradige Polynome $f(r)$ gemäß

$$f(r) = \sum_{i=0}^6 c_i \cdot r^i$$

Tab. 7: Koeffizienten für die interpolierende polynomiale Kurvenanpassungen*

i	G_r	A_r	V_r
0	1	0.5	0
1	0.492	0.401	1.477
2	5.607	0.070	-2.016
3	-38.570	0.328	4.048
4	72.103	-0.299	-3.594
5	-58.864	0	1.085
6	18.231	0	0

Koeffizienten (i) der Polynome $f(r)$ für die Oberflächenspannung (G_r), die Oberfläche (A_r) und das Volumen (V_r) in den Berechnungen für Blasen (Kap. 7.12, S. 47). Aus [96].

Zur Berechnung der Meßwerte werden zunächst die Pixelzahlen der Vermessung von Höhe und Durchmesser der Luftblase in Längenmaße umgerechnet, entsprechend einer vorangegangenen Eichung der Abbildung der Blase (Kap. 7.10). Anschließend werden die Oberflächenspannung γ , die Oberfläche A und das Volumen V der Luftblase bestimmt zu:

$$\gamma = \rho \cdot g \cdot \left(\frac{h}{2}\right)^2 \cdot \frac{1}{G_r}, \quad A = \pi \cdot d^2 \cdot A_r \quad \text{und} \quad V = \pi \cdot d^3 \cdot \frac{1}{6} \cdot \frac{1}{V_r} \quad [96].$$

mit Höhe h und Durchmesser d der Luftblase, spezifischer Dichte der Probe ρ , Erdbeschleunigung g ($981.2915 \text{ cm s}^{-2}$ [58]). Das Suffix r kennzeichnet den Wert $r=h/d$ für die jeweilige Approximation (Oberflächenspannung G , Oberfläche A und Volumen V). Die Oberflächenspannung, das Volumen und das Termglied G_r (nach [61]) in Abhängigkeit vom Verhältnis r zeigt Abb. 8 (S. 50). Die unterschiedliche Veränderung der Oberflächenspannung durch Steuerung des Blasen volumens veranschaulicht Abb. 9 (S. 50) für unterschiedlich große Ausgangswerte des Blasendurchmessers.

* Eine vorläufige Version wurde von Prof. J. Goerke, Cardiovascular Research Institute, University of California, San Francisco, USA, zur Verfügung gestellt.

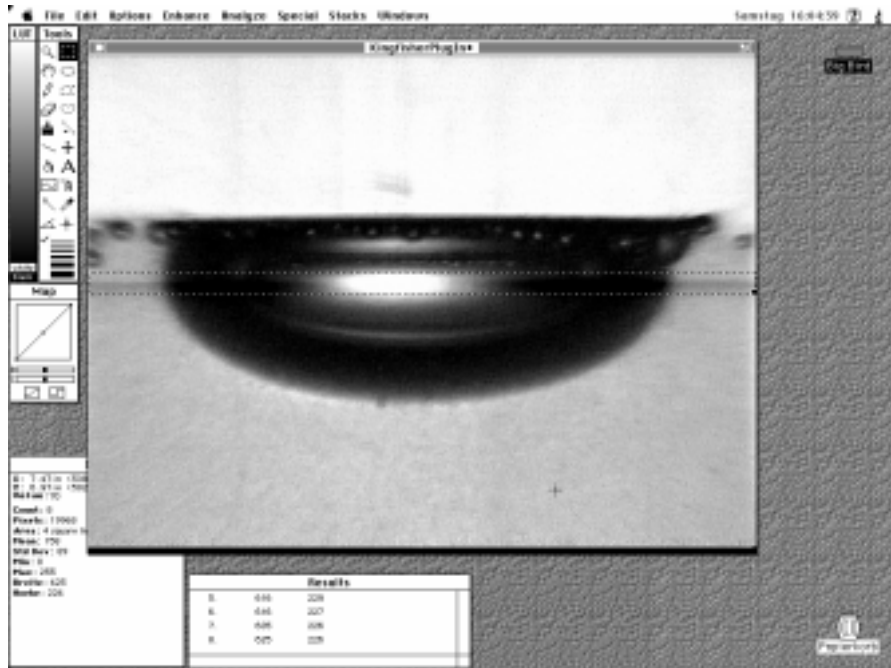


Abb. 6: Bildverarbeitung: Digitalisierung einer Luftblase

Digitalisiertes Videokamerabild der Seitenansicht einer Luftblase während eines Versuchs mit unlöslichem Surfactant (KS). Aus der Markierung (gestrichelte Linie), die den größten Durchmesser der Luftblase einschließt, wird ein Schnittbild errechnet (Abb. 7). Dargestellt ist der Arbeitsbereich des zur Bildverarbeitung eingesetzten Computers. Das digitalisierte Bild der Luftblase kann in voller Größe und originaler, pixelgerechter Auflösung bearbeitet werden.

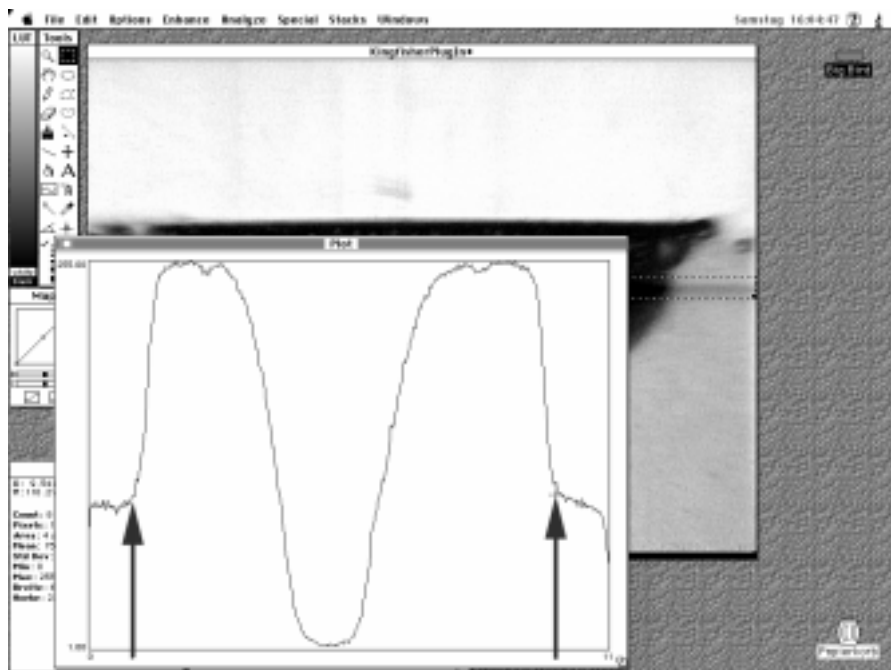


Abb. 7: Bildverarbeitung: Bestimmung der Blasenabmessungen

Darstellung der Grauwert-Dichte (Ordinate) des Schnittbildes der Luftblase aus Abb. 6 in Abhängigkeit von der Schnittstelle (Abszisse). Pfeilspitzen markieren die Begrenzungen der Luftblase. Der horizontale Abstand zwischen den Pfeilen entspricht dem größten Durchmesser der Luftblase.

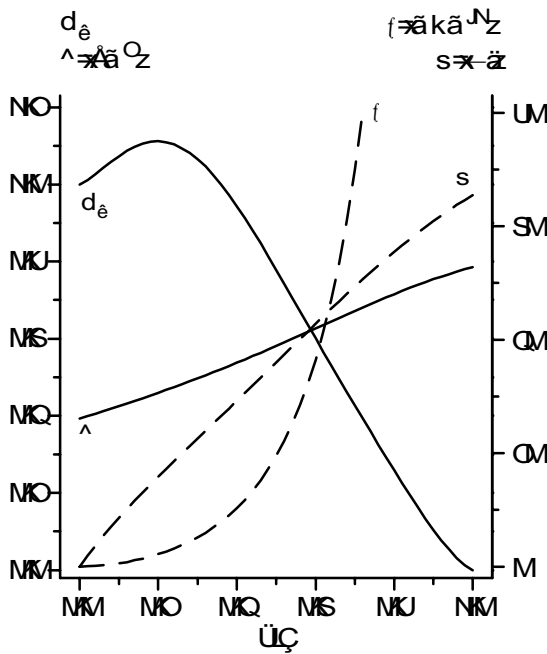


Abb. 8: Funktionswerte der Approximationen bei unterschiedlicher Blasengeometrie

Beispiel für die Abhängigkeit der Untersuchungsgrößen Oberflächenspannung, Volumen und Oberfläche von der Geometrie einer bestimmten Luftblase. Termglied G_r , Oberfläche A , Volumen V und Oberflächenspannung γ in Abhängigkeit vom Höhen-Durchmesser-Verhältnis (h/d) einer Blase mit festgelegtem Durchmesser (5 mm).

Die Abbildung zeigt die berechneten Werte (Kap. 7.12, S. 47), die bei einem gegebenen Durchmesser nicht-linear durch die Blasengeometrie (h/d) bestimmt werden. Mit zunehmenden Werten für h/d nimmt eine scheibenförmige Blase eine Kugelform an (vgl. beispielhafte Blasen in Abb. 1, S. 14).

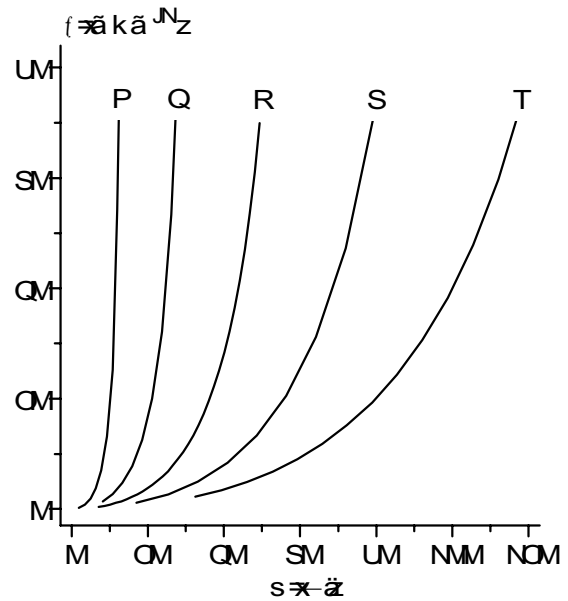


Abb. 9: Oberflächenspannungen bei unterschiedlicher Blasengröße

Beispiel für den unterschiedlichen Einfluß der druckgesteuerten Veränderung des Blasenvolumens (V) auf die Oberflächenspannung (γ), dargestellt für verschiedene Blasengrößen (Durchmesser entsprechend den Zahlenangaben 3–7 mm). Das Blasenvolumen ist proportional zum Druck im Drucksystem.

Bei größeren Blasen können mittlere und hohe Oberflächenspannungen besser als bei kleinen bestimmt werden, weil die Oberflächenspannung in geringerem Ausmaß durch die Steuerung des Drucks beeinflusst wird und damit präziser zu bestimmen ist.

7.13 Auswertung

Die Lagemaße normalverteilter Daten umfassen den arithmetischen Mittelwert als beste Näherung an den wahren Wert und die Standardabweichung des Einzelwertes als Verteilungsmaß einer Einzelmessung.* Der Variationskoeffizient normiert die Standardabweichung auf den Mittelwert. Der Kolmogoroff-Smirnoff-Test wird verwendet, um das Vorliegen einer Normalverteilung nachzuweisen. Im Streu-

* Schreibweise im weiteren Text: Mittelwert \pm Standardabweichung.

diagramm wird der Mittelwert als Punkt und die Standardabweichung durch einen Fehlerbalken angezeigt, der bei kleinen Werten verborgen sein kann.

Daten, denen keine Normalverteilung zugrunde liegt oder die nur wenige Werte mit großer Abweichung umfassen, werden durch Quantile der empirischen Verteilung beschrieben, insbesondere durch den Median und die Spannweite zwischen größtem und kleinsten Wert.* Die entsprechenden Boxplots zeigen den Median (waagrechtlicher Strich), die interquartile Spanne (Boxen) sowie die fünfte und 95. Perzentile (Nadeln) der Daten. Der nichtparametrische Mann-Whitney-Wilcoxon-Test (U-Test) wird verwendet, um die Verteilung und Mediane zweier Meßreihen zu vergleichen. Alle hier eingesetzten statistischen Tests werden für eine Irrtumswahrscheinlichkeit (α) von 0.05 berechnet.

Eine lineare Regression wird verwendet, wenn Datenpunkte augenscheinlich einer Ausgleichsgerade folgen. Der Regressionskoeffizient r wird mit Hilfe eines t-Tests auf Verschiedenheit von null untersucht [119]. Eine nicht-lineare Regression wird für die Berechnung der Oberflächenspannungen des wasserlöslichen Surfactants nach der Szyszkowski-Gleichung (Kap. 3.2) verwendet (Levenberg-Marquardt-Methode [82]). Ein verallgemeinertes lineares Modell wird zur quantitativen Beurteilung von verschiedenen, gleichzeitig auftretenden Einflußfaktoren auf eine Zielgröße eingesetzt [59]. Eine Gewichtung der Einzelbeobachtung in diesen Regressionen wurde gegebenenfalls mit dem quadratischen Kehrwert der Residuen vorgenommen. Die Konfidenzbereiche der Regressionen zeigen das 95 %-Konfidenzintervall eines vorhergesagten Einzelwertes. Für alle Regressionen und Modelle entspricht der berechnete Wert R^2 demjenigen Anteil der gesamten Varianz der Daten, der durch die Regression oder das Modell erklärt wird.

Die Meßgrößen der Kompressibilität, Hysterese-Fläche, Stabilität und Adsorptionskinetik werden aus Oberflächenspannungs-Oberflächen-Isothermen und Oberflächenspannungs-Zeit-Verläufen numerisch bestimmt.

Die Kompressibilität k_γ ist die Tangentensteigung während der Kompression der Oberfläche A zu einer gegebenen Oberflächenspannung γ , meist 15 mNm^{-1} . Die Berechnung verwendet dazu eine polynomiale Kurvenanpassung der diskreten Wertepaare zur Funktion $A(\gamma)$ mit der analytischen Ableitung $A'(\gamma)$. Die Kompressibilität ist dann $k_\gamma = 1 / A(\gamma) \cdot A'(\gamma)$ mit $[k_\gamma] = 1 \text{ mmN}^{-1}$.

Die Berechnung der Hysterese-Fläche zwischen den Wertepaaren von Oberflächenspannung und Oberfläche in einem gegebenen Kompressions-Expansions-Zyklus beruht auf einer interpolierenden Approximation mit Hilfe von Bezier-

* Schreibweise im weiteren Text: Median (Minimum-Maximum).

Splines [31]. Die Funktionswerte der Splines werden numerisch integriert und für jedes Experiment getrennt zur Hysterese-Fläche (H) standardisiert. Deren Einheit ist das Produkt der Einheiten der Achsen (1 cm^2 beziehungsweise 1 mNm^{-1}) und stellt damit auch ein Maß einer Arbeit ($1 \text{ cm}^2 \cdot \text{mNm}^{-1} = 10^{-7} \text{ J}$) dar.

Die Adsorptionskinetik wird durch Anpassung der Senkung der Oberflächenspannung in Abhängigkeit von der Zeit an eine exponentielle Verfallsfunktion bestimmt: $\gamma = \gamma_0 + ae^{-t/k}$ mit Zeitkonstante k, Skalierungsfaktor a und Oberflächenspannung γ zum Zeitpunkt t beziehungsweise γ_0 zum Zeitpunkt des erreichten Gleichgewichts ($t \rightarrow \infty$). Durch diese Anpassung werden die Gleichgewichts-Oberflächenspannung γ_0 und die Halbwertszeit der Senkung der Oberflächenspannung $t_{1/2} = 0.69/k$ bestimmt.

Im Anschluß an diese Darstellung der Methoden, die im Zusammenhang mit dem eigenen Captive-Bubble-Surfactometers verwendeten wurden, werden im folgenden die Ergebnisse aus dem Einsatz dieses Meßinstruments zur Testung biophysikalischer Oberflächenaktivität dargelegt.

8 Ergebnisse

Nach dem Aufbau des eigenen Captive-Bubble-Surfactometers (Kap. 6) bestand ein weiterer wesentlicher Teil dieser Arbeit aus dem Einsatz und der Erprobung des Gerätes mit Substanzen bekannter Oberflächenspannung und bekannten Kompressionsverhaltens. Dabei wurde löslicher Surfactant (Ethanol in Wasser) zur Validierung der Meßwerte der bekannten Oberflächenspannung eingesetzt. Die unlöslichen Surfactants DPPC, KS (künstlicher Surfactant) und BLES (boviner Lipid-Extraktions-Surfactant) wurden zur Untersuchung des bekannten Kompressionsverhaltens und weiterer biophysikalischer Eigenschaften verwendet. Einige bekannte biochemische Charakteristika von natürlichem Surfactant aus einem Lungenschädigungs-Modell wurden zusätzlich mit Bezug zur Untersuchung der unbekannt biophysikalischen Eigenschaften bestimmt. Eine Übersicht über die insgesamt im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Messung der Oberflächenaktivität durchgeführten Experimente und die dazu verwendete Einteilung der verschiedenen Surfactants stellt Abb. 30 (S. 80) dar.

Um reproduzierbare Messungen mit dem Captive-Bubble-Surfactometer durchzuführen, mußten zunächst stabile Versuchsbedingungen erreicht werden und die Eichung der Abbildung erfolgen. Die Beständigkeit dieser Rahmenbedingungen wurde überprüft, indem die auftretenden Abweichungen der Temperaturregelung, Vermessung, Eichung und Symmetrie der Blase bestimmt wurden.

8.1 Überprüfung der experimentellen Rahmenbedingungen

Die Konstruktion des Captive-Bubble-Surfactometers umfaßte zwei verschiedene Heizungssysteme, die eine unterschiedlich gute Kontrolle der Temperatur realisierten. Die Praktikabilität und Schwankungsbreite der Heizungssysteme wurden miteinander verglichen. Das Heizungssystem I konnte nur eine sehr langsame Erwärmung des Versuchskubus und indirekt auch des Küvetteninhaltes erreichen. Dafür ist eine nur geringe Wärmeübertragung an den Küvetteninhalt verantwortlich, denn das Küvettenglas konnte konstruktionsbedingt nicht allseitig dem beheizten Kubus anliegen. Dieses System arbeitete jedoch unabhängig von der ansonsten notwendigen Durchmischung der Probe.

Das Heizungssystem II kontrollierte die Temperatur der Probe zu 37 ± 0.5 °C nach einer initialen Heizzeit von 135 s mit einer Regelperiode von 90 s bei einer Amplitude von 0.5 K (Abb. 10, S. 54). Diese Werte setzte allerdings einen Wärmetransport und eine ununterbrochene Durchmischung der Probe durch kontinuierliches Rühren voraus sowie zusätzlich die Erfassung der Probertemperatur mit einem Fühler innerhalb der Meßkammer. Das Heizungssystem II bot im Vergleich die

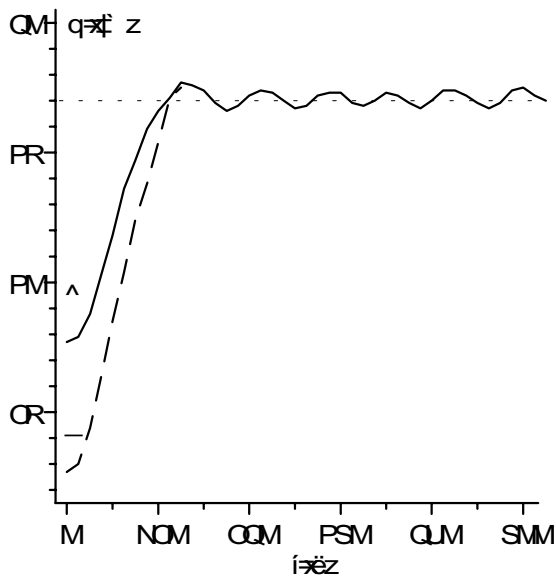


Abb. 10: Temperaturregelung:
Heizungssystem II

Temperatur (T) gemessen innerhalb der Probenflüssigkeit in Abhängigkeit von der Zeit (t). Ausgangstemperatur 27.7 °C und Heizleistung 70% (A) beziehungsweise 22.7 °C und 90 % (B). Bei Erreichen von 35 °C wird die Heizleistung automatisch auf 40 % reduziert. Solltemperatur 37 °C (horizontale, gepunktete Linie). Nach einer initialen Aufheizzeit von 135 s wird die Solltemperatur mit einer maximalen Abweichung von 0.5 K sowie einer Regelperiode von 90 s erreicht.

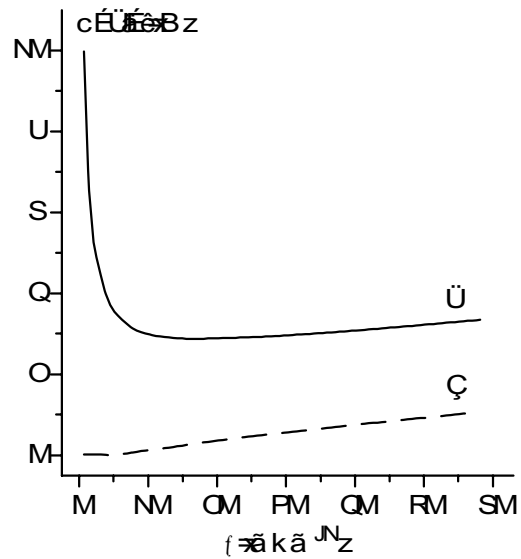


Abb. 11: Auswirkung fehlerhafter Blasenvermessung auf die Oberflächenspannung

Prozentualer Fehler der Oberflächenspannung in Abhängigkeit von der tatsächlichen Oberflächenspannung (γ), dargestellt für einen angenommenen Vermessungsfehler (zwei Pixel) der Blasenhöhe (h) und des Durchmessers (d). Die Berechnung einer niedrigen Oberflächenspannung wird stärker durch die fehlerhafte Vermessung der Blasenhöhe als des Durchmessers beeinträchtigt. Die Auswirkung eines Fehlers des Durchmessers nimmt gegenüber derjenigen der Blasenhöhe mit steigender Oberflächenspannung stärker zu.

bessere Temperaturregelung, erforderte aber einen größeren Aufwand an Beobachtung und Eingriffen durch den Untersucher. Während der Versuche mit dem Captive-Bubble-Surfactometer wurden beide Heizungssysteme (I und II) gleichzeitig eingesetzt, um eine grundlegende Erwärmung des gesamten Kubus (I) mit einer hohen Genauigkeit und Geschwindigkeit (II) zu verbinden.

Die Berechnung der Oberflächenspannung der Grenzfläche einer Luftblase erfordert die Bestimmung der Blasenabmessungen in absoluten Streckeneinheiten. Die digitalisierten Videobilder können jedoch lediglich in Videobildpixeln ausgemessen werden, so daß eine wiederholte Eichung des Verhältnisses von Pixeln zu Strecken und damit der Abbildung der Luftblasen erforderlich wurde. Hierzu wurde für insgesamt 21 Eichungen eine Vermessung des Eichgitters (4.4 mm, Kap. 7.10) mit Hilfe des Küvetten-Einsatzes (Kap. 6.2.1) durchgeführt.

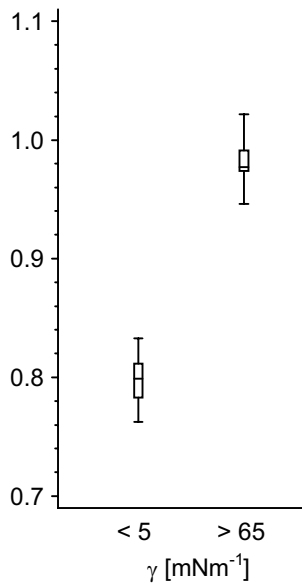


Abb. 12: Untersuchung der Blasensymmetrie

Verhältnis des kleineren zu größerem Wert zweier orthogonaler Durchmesser der Aufsicht auf die Luftblase in Abhängigkeit von der Oberflächenspannung (γ). Verteilung von 57 Meßwerten (Boxplots, Kap. 7.13, S. 50). Die Luftblasen werden durch die hohe Oberflächenspannung hinsichtlich ihrer senkrechten Rotationsachse stabilisiert, während bei niedriger Oberflächenspannung Tiefe und Durchmesser voneinander abweichen. Bei niedriger Oberflächenspannung ist die Auswirkung eines Fehlers des Blasendurchmessers allerdings gering (Abb. 11, S. 54).

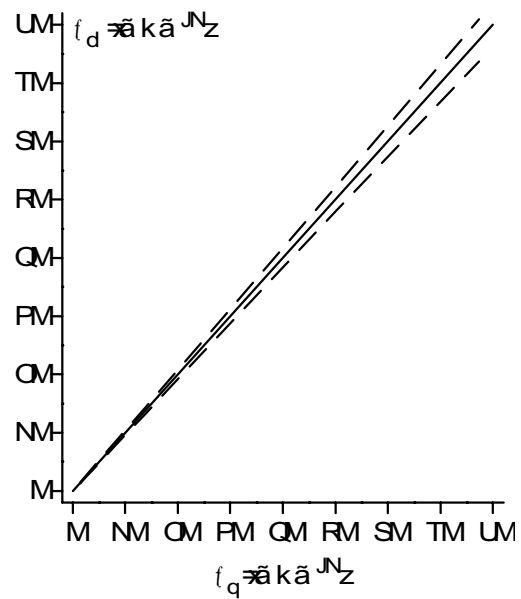


Abb. 13: Gesamtfehler der Messung der Oberflächenspannung

Gemessene (γ_G) und tatsächliche (γ_T) Oberflächenspannung. Dargestellt ist das Fehlerintervall (gestrichelte Linien) für die Erwartungswerte der Oberflächenspannung (durchgezogene Linie).

Die Messung der Oberflächenspannung ist mit zunehmenden Werten stärker fehleranfällig. Das Fehlerintervall zeigt die zusammengefaßte Auswirkung sämtlicher Fehler als mögliche Abweichung der gemessenen von der tatsächlichen Oberflächenspannung. Diese Fehler sind: Vermessungsfehler, abweichende Symmetrie sowie Varianzen der Kurvenanpassungen.

Die Umrechnungsfaktoren wurden getrennt für die Höhe und den Durchmesser der Eichgitter bestimmt und ergaben im Mittel 71.34 Pixel pro 1 mm Höhe und 76.08 Pixel pro 1 mm Durchmesser. Das von der Abbildungsgröße unabhängige Verhältnis aller Umrechnungsfaktoren betrug $h/d=0.938\pm 0.012$.

Die Genauigkeit der Vermessung des Linienquadrats der Eichküvette wurde bei insgesamt 14 Eichungen bestimmt. Die maximalen Variationskoeffizienten der Höhe und des Durchmessers betragen jeweils 0.4 %. Die Auswirkung von fehlerhaften Vermessungen wurde mit Hilfe eines angenommenen Fehlers von 2 Pixeln, jeweils getrennt für die Höhe und den Durchmesser, simuliert (Abb. 11, S. 54). Ein Fehler in der Vermessung der Höhe führte demnach zu einer größeren Abweichung der Oberflächenspannung als ein Fehler des Durchmessers.

Die Beständigkeit der Rahmenbedingung einer Rotationssymmetrie der Luftblase bezüglich einer senkrechten Achse wurde exemplarisch in Experimenten mit reinem Wasser und reinem DPPC-Surfactant bei entsprechend hoher und niedriger Oberflächenspannung bestimmt. Nach einer gesteuerten Oberflächenveränderung trat in der Aufsicht zunächst eine elliptische Verformung der Luftblase auf, die nach wenigen Sekunden eine stabile Form annahm und zu diesem Zeitpunkt vermessen wurde. In 59 Bildern der Aufsicht auf diese Luftblasen wurden jeweils zwei orthogonale Durchmesser vermessen, die beispielsweise Tiefe (t) und Durchmesser (d) der Seitenansicht entsprachen. Das Verhältnis von kleinerem zu größerem Wert (t/d für $t < d$ oder d/t für $d < t$) wurde als Maß für die Rotationssymmetrie berechnet (Abb. 12, S. 55). Bei rotationssymmetrischen Blasen ist $t/d = d/t = 1$ zu erwarten. Für Luftblasen mit hoher Oberflächenspannung ($> 65 \text{ mNm}^{-1}$) betrug dieses Verhältnis 0.98 ± 0.02 und für solche mit niedriger Oberflächenspannung ($< 5 \text{ mNm}^{-1}$) 0.80 ± 0.02 . Diese Verhältnisse unterschieden sich hinsichtlich Verteilung und zentraler Tendenz.

Der Gesamtfehler der Messungen der Oberflächenspannung wurde als Fehlerintervall mit Hilfe folgender, bereits überprüfter Fehlerquellen abgeschätzt: fehlerhafte Blasenhöhenvermessung (Abb. 11, S. 54), abweichende Rotationssymmetrie (Abb. 12, S. 55) sowie Varianzen der Kurvenanpassung an Referenzblasen (1.706 % [96]) und des Korrekturgliedes für gekrümmte Grenzflächen (0.041 % [61]). Das Fehlerintervall zeigte, daß die größtmögliche Abweichung der gemessenen von der tatsächlichen Oberflächenspannung 2.1 mNm^{-1} bei einer Oberflächenspannung von 70 mNm^{-1} beträgt (Abb. 13, S. 55).

Die experimentelle Überprüfung der wesentlichen Rahmenbedingungen der Messungen mit dem eigenen Captive-Bubble-Surfactometer zeigte mögliche Fehlerquellen und den dadurch verursachten geringen Gesamtfehler der Oberflächenspannung. Unter Berücksichtigung der so kontrollierbaren und stabilen Rahmenbedingungen wurde das Captive-Bubble-Surfactometer zunächst zur Messung der bekannten Oberflächenspannung von löslichem Surfactant eingesetzt.

8.2 Messung löslichen Surfactants

Nachdem die allgemeinen Rahmenbedingungen bei Messungen mit dem Captive-Bubble-Surfactometer als stabil gefunden wurden, wurde das Instrument zunächst zur experimentellen Bestätigung von bekannten Meßwerten löslichen Surfactants eingesetzt. Hierzu wurde die Oberflächenspannung des löslichen Surfactants Ethanol in Wasser gegen Luft gemessen, wobei quasi-statische Zyklen entsprechend den anschließend untersuchten unlöslichen Surfactants verwendet

wurden. Bei diesem Surfactant ist die Oberflächenspannung einer Probe konstant und unabhängig von der räumlichen Struktur der Grenzfläche und damit vom experimentellen Aufbau.

Von 29 Experimenten mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ethanol in Wasser wurden 18 Versuche mit jeweils durchschnittlich 29 Meßwerten ausgewählt, die mindestens zwei quasi-statische Zyklen umfaßten und Oberflächenspannungs-Oberflächen-Kurven zeigten, die für löslichen Surfactant repräsentativ sind. Von 30 Experimenten mit Wasser wurden sechs Versuche mit jeweils durchschnittlich 22 Meßwerten zur Auswertung herangezogen, in denen nur Oberflächenspannungen über 65 mNm^{-1} auftraten und deren quasi-statische Zyklen repräsentativ für die weiteren Versuche mit Wasser waren. Einige Versuche waren nicht auswertbar, weil bei hohen Drücken Undichtigkeiten auftraten.

Die in diesen Experimenten gemessenen Oberflächenspannungen (γ) sind zusammen mit den bereits bekannten Werten (γ^*) in Abhängigkeit von der Ethanol-Konzentration in Tab. 8 wiedergegeben. Der berechnete Oberflächenüberschuß bei Sättigung Γ^∞ war $5.53 \cdot 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ und die berechnete Langmuir-von Szyszkowski-Verteilungskonstante war 46 mmol cm^{-3} (Kap. 3.2, S. 6).

Für die weitere Auswertung wurden diese Experimente zusammengefaßt und durch eine Anpassung an die Szyszkowski-Gleichung analysiert. Der Anteil der dadurch erklärten Varianz aller Meßwerte betrug $R^2=0.987$. Die Verteilung der Meßwerte, die Anpassung und die Konfidenzbereiche sind in Abb. 14 (S. 58)

Tab. 8: Oberflächenspannung unterschiedlicher Konzentrationen von Ethanol in Wasser

Ethanol [%]	ρ [gml ⁻¹]	n_1	n_2	γ [mNm ⁻¹]	$\gamma^\#$ [mNm ⁻¹]	γ^* [mNm ⁻¹]
0	0.992	6	132	68.4±4.2	69.7	69.6
5	0.989	3	88	57.3±0.8	55.7	54.9
10	0.982	3	79	48.4±0.03	49.0	48.3
24	0.969	3	99	38.0±0.7	39.1	35.5
48	0.934	3	109	30.3±0.2	30.4	28.9
72	0.877	3	88	25.4±0.2	25.2	24.9
96	0.808	3	60	22.4±0.4	21.5	21.4

Mittelwerte des spezifischen Gewichts (ρ) der Proben aus Doppelbestimmungen. Anzahl der Experimente (n_1) und Meßwerte (n_2). Mittelwerte und Standardabweichungen der Meßwerte der Oberflächenspannung (γ). Funktionswerte der Szyszkowski-Gleichung ($\gamma^\#$) gemäß der nicht-linearen Anpassung aller Meßwerte (Abb. 14, S. 58). Referenzwerte (γ^*) bei 40 °C [58].

dargestellt. Die durch diese Analyse bestimmten Oberflächenspannungen ($\gamma^\#$) sind in Tab. 8 (S. 57) den Mittelwerten der Experimente gegenübergestellt.

In diesen Experimenten mit löslichem Surfactant wurde ein Einfluß der Größenveränderung der Luftblasen-Oberfläche während der quasi-statischen Zyklen auf die als konstant anzunehmende Oberflächenspannung mit Hilfe einer linearen Regression analysiert. Der Regressionskoeffizient r (die Steigung der Ausgleichsgeraden zwischen Oberflächenspannung und Oberfläche) war 0.02 (-0.02 – 0.09) $\text{mNm}^{-1}\%^{-1}$ und war in 13 der 24 Versuche jeweils von null verschieden, davon in 9 dieser 24 Versuche größer als null.

Das bedeutet, daß in diesen Versuchen die Größenveränderung der Grenzfläche einen Einfluß auf deren Oberflächenspannung hatte. Der eingesetzte lösliche Surfactant kann diese variable Oberflächenaktivität nicht verursachen, sondern es

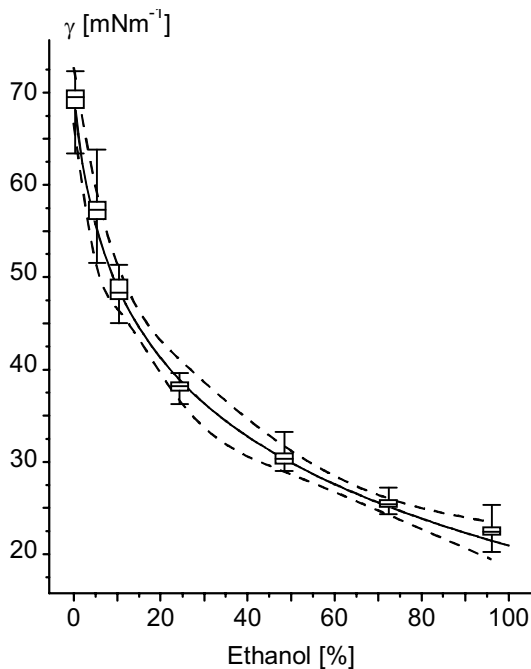


Abb. 14: Oberflächenspannungen von löslichen Surfactants

Oberflächenspannung (γ) in Abhängigkeit von der Konzentration von Ethanol in wässriger Lösung. Verteilung von 561 Meßwerten aus 24 Experimenten (Boxplots). Anpassung der Szyszkowski-Gleichung (durchgezogene Linie) und deren 95 %-Konfidenzbereich (gestrichelte Linien).

Der Anteil der erklärten Varianz ist 0.987. Mit zunehmender Konzentration von Ethanol in Wasser nimmt die Oberflächenspannung der Lösung nicht-linear ab.

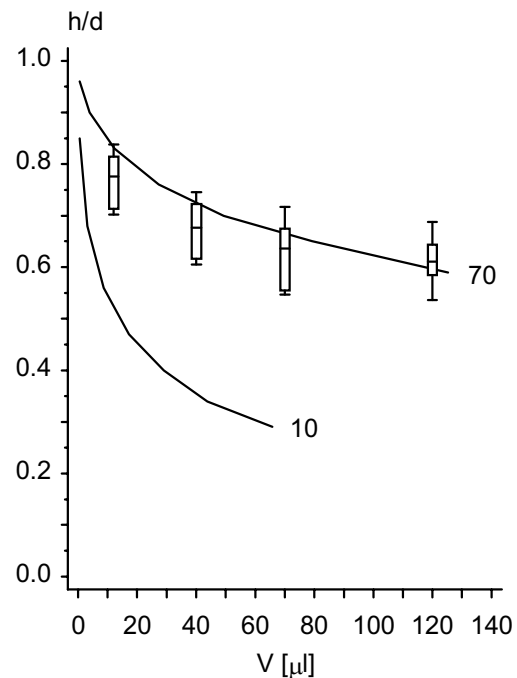


Abb. 15: Blasengeometrie zu Versuchsbeginn

Höhen-Durchmesser-Verhältnis (h/d) in Abhängigkeit vom initialen Blasenvolumen (V). Meßwerte von 89 Luftblasen in Experimenten mit Wasser (Boxplots) und simuliertes Verhältnis bei Oberflächenspannungen von 70 und 10 mNm^{-1} (Linien).

Bei Luftblasen in Wasser (70 mNm^{-1}) weicht das Höhen-Durchmesser-Verhältnis desto stärker von den für 70 zu denen für 10 mNm^{-1} simulierten Werten ab, je geringer das initiale Blasenvolumen ist.

muß die Anwesenheit weiterer Substanzen angenommen werden, die als Verunreinigung von Teilen des Captive-Bubble-Surfactometers auftreten.

In der Auswertung dieser Versuche zeigte sich, daß unterschiedliche Volumina für die Luftblase zu Versuchsbeginn mit einem unterschiedlichen Ausmaß an geometrischer Verformung und Veränderungen von Höhe und Durchmesser der Blase einher gingen (Meßwerte Abb. 15, S. 58). Luftblasen mit kleinem Volumen sind bei gleicher Oberflächenspannung weniger abgeflacht und haben ein größeres Verhältnis von Höhe zu Durchmesser als Luftblasen mit hohem Volumen. Für den zu erwartenden Bereich der Oberflächenspannung kann in umgekehrter Weise ein passendes Blasenvolumen gewählt werden (Simulation Abb. 15, S. 58).

Die Versuche zeigten zusammenfassend, daß mit dem Captive-Bubble-Surfactometer bekannte Oberflächenspannungen löslicher Surfactants reproduziert werden konnten. Einen unerwarteten Einfluß der Oberflächengröße auf die Oberflächenspannung verursachten anfänglich unbekannte Substanzen, die das Captive-Bubble-Surfactometer verunreinigten. Die beobachtete Varianz der Meßwerte kann durch statistische Verfahren erklärt werden. Im folgenden werden die Ergebnisse der Messung der biophysikalischen Oberflächenaktivität unlöslicher Surfactants vorgestellt, die eine variable Oberflächenspannung zeigen.

8.3 Messung unlöslicher Surfactants

Nachdem wasserlösliche Substanzen auf ihre Oberflächenspannungseigenschaften untersucht wurden, sollten in Wasser unlöslichen Surfactants charakterisiert werden. Dabei handelte es sich um reinen DPPC-Surfactant (DPPC), künstlichen Surfactant (KS, Exosurf[®]), bovinen Lipid-Extraktions-Surfactant (BLES, Alveofact[®]) und natürlichen Surfactant. Die Ergebnisse mit DPPC, KS und BLES werden in diesem Abschnitt und die Ergebnisse mit natürlichem Surfactant im folgenden Abschnitt (Kap. 9.4) beschrieben.

Unlösliche Surfactants unterscheiden sich wesentlich von den zuvor gemessenen löslichen Surfactants, da ihre Oberflächenspannung variabel ist und von der experimentell vorgegebenen Struktur der Grenzfläche abhängt. Die biophysikalischen Eigenschaften unlöslicher Surfactants wurden jeweils durch Messung der Oberflächenspannung in bezug zur Zeit (Adsorption), zur Oberfläche (quasi-statische Zyklen) oder zu beiden Größen (dynamische Zyklen) untersucht.

8.3.1 Reiner DPPC-Surfactant

8.3.1.1 Adsorption

Adsorptionsmessungen wurden mit Suspensionen von DPPC zehnmal bei einer Phospholipidkonzentration von 0.2 mgml^{-1} , dreimal bei 1 mgml^{-1} und zweimal bei 1.75 mgml^{-1} durchgeführt (Abb. 16). In Versuchen mit 0.2 mgml^{-1} DPPC war die Oberflächenvergrößerung 405 (309–501) %, die Halbwertszeit 93.4 (74.2–117.3) s und die Gleichgewichts-Oberflächenspannung 30.7 (29.0–35.7) mNm^{-1} . Die Versuche mit 1.0 mgml^{-1} DPPC hatten eine Oberflächenvergrößerung von 200 %, während die Halbwertszeit und Gleichgewichts-Oberflächenspannung nicht zu beobachten war. In Versuchen mit 1.75 mgml^{-1} DPPC war die Oberflächenvergrößerung 200 %, die Halbwertszeit 145.9 s und die Gleichgewichts-Oberflächenspannung 27.5 mNm^{-1} .

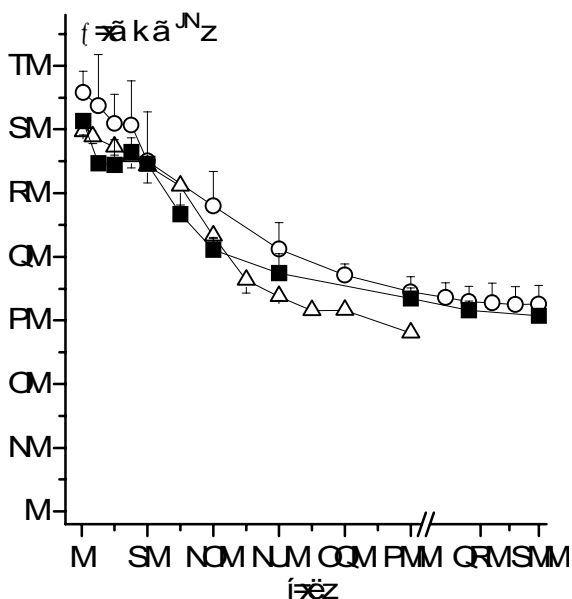


Abb. 16: Adsorptionsverlauf von DPPC

Phospholipidkonzentrationen 0.2 (O), 1 (Δ) und 1.75 (\blacksquare) mgml^{-1} . Mittel und Standardabweichung der Oberflächenspannung (γ) von je drei Experimenten in Abhängigkeit von der Adsorptionsdauer (t).

Die Adsorptionsverläufe werden durch die unterschiedliche Phospholipidkonzentration nur geringfügig beeinflusst.

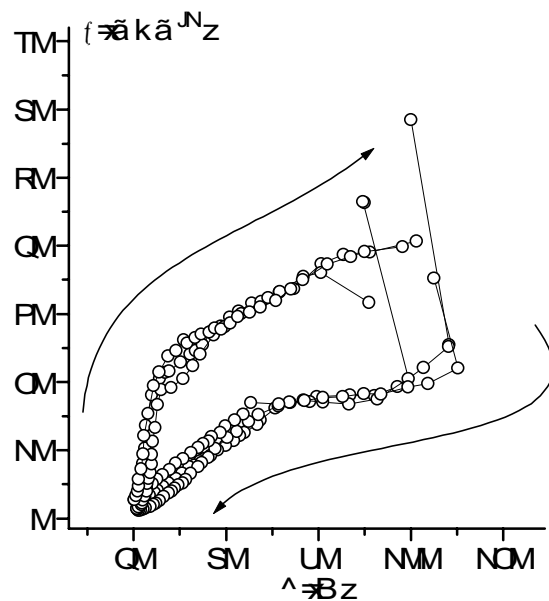


Abb. 17: Quasi-statische Zyklen von DPPC

DPPC in organischer Lösung wurde direkt auf die Grenzfläche aufgetragen. Oberflächenspannung (γ) im ersten Zyklus in Abhängigkeit von der Oberfläche (A) in drei Experimenten. Die Experimente zeigen die für DPPC charakteristischen Oberflächen-Oberflächenspannungs-Isothermen, in denen verschiedene kontinuierliche Abschnitte auftreten. Pfeile zeigen aufeinanderfolgende Meßwerte.

8.3.1.2 Quasi-statische Zyklen

Quasi-statische Zyklen wurden durchgeführt, indem DPPC entweder direkt in die Oberfläche eingebracht wurde oder indem unterschiedliche DPPC-Suspensionen eingesetzt wurden.

8.3.1.2.1 DPPC-Injektion in die Oberfläche

Eine organische DPPC-Lösung wurde in 19 Experimenten direkt in die Oberfläche einer Luftblase injiziert, die bereits in reinem Wasser unterhalb der Agarose-Deckelschicht in der Meßküvette flutete. Das Volumen der eingebrachten DPPC-Lösung lag zwischen 0.1 und 50 μl bei einer Konzentration von 2 mgml^{-1} DPPC in Methanol, entsprechend einer absoluten Menge von 0.2 bis 100 μg DPPC. Die Luftblasen hatten dabei ein initiales Volumen von 25 bis 50 μl .

Repräsentative und reproduzierbare quasi-statische Zyklen wurden unter Verwendung von 0.5 μg DPPC bei einem Volumen der Luftblase von $26.4 \pm 2.3 \mu\text{l}$ und einer Oberfläche von $1.17 \pm 0.13 \text{ cm}^2$ erreicht (Abb. 17, S. 60). Die Konzentration von DPPC in der Oberfläche betrug in diesen Versuchen zu Beginn ungefähr $0.43 \mu\text{gcm}^{-2}$. Die maximalen und minimalen von einem DPPC-Molekül eingenommenen Flächen war jeweils $72 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2$ und $(15 \pm 3) \cdot 10^{-20} \text{ m}^2$. Die maximalen und minimalen Flächen bezogen auf die eingesetzte Menge an DPPC waren $2.4 \pm 0.3 \text{ cm}^2 \mu\text{g}^{-1}$ und $0.9 \pm 0.2 \text{ cm}^2 \mu\text{g}^{-1}$.

Die minimale Oberflächenspannung war $2.1 \pm 0.9 \text{ mNm}^{-1}$ bei Kompression der Oberfläche auf $35 \pm 6 \%$. Durch 40 % Oberflächenverkleinerung wurde die Oberflächenspannung zunächst um lediglich 5 mNm^{-1} verringert, während sie durch anschließende 25 % Verkleinerung um 15 mNm^{-1} abnahm. Die Kompressibilität in den dargestellten ersten Kompressionsphasen war $0.066 (0.052-0.084) \text{ mmN}^{-1}$. Die Verläufe der Kompressionen während der abgebildeten quasi-statischen Zyklen zeigten ein flaches Plateau bei 18 mNm^{-1} , das gleichfalls bei anderen Konzentrationen und während der Expansion beobachtet wurde (Abb. 17, S. 60).

8.3.1.2.2 DPPC-Suspension

Es wurden sechs Experimente unter Verwendung einer Suspension von 0.1 mgml^{-1} DPPC drei mit 1 mgml^{-1} durchgeführt. Von den insgesamt neun Versuchen wurden sieben Versuche ausgewertet, in denen mindestens drei quasi-statische Zyklen aufgezeichnet werden konnten und die daher als repräsentativ für diesen wasserunlöslichen Surfactant angesehen werden konnten. Die Charakteristika der ersten Zyklen sind in Tab. 9 (S. 62) zusammengefaßt.

Tab. 9: Quasi-statische Zyklen mit Suspensionen von DPPC

DPPC [mgml ⁻¹]	n	z	γ_{\max} [mNm ⁻¹]	γ_{\min} [mNm ⁻¹]	k [mmN ⁻¹]	ΔA [%]	H [cm ² mNm ⁻¹]
0.1	4	1	69.2	29.9	-	89.5	2.1
		2	66.1	27.0	-	87.4	2.7
1.0	3	1	49.7	3.2	0.024	95.1	14.4
		3	49.5	1.8	0.012	70.4	8.2

Anzahl der Versuche (n), Nummer des ausgewerteten Zyklus (z), maximale (γ_{\max}) und minimale (γ_{\min}) Oberflächenspannung, Kompressibilität (k), Oberflächenverkleinerung (ΔA) und Hysterese-Fläche (H, vgl. Kap. 7.13, S. 50).

Um den Verlauf der quasi-statischen Zyklen zu mit DPPC zu vergleichen, wurde eine Kategorisierung der Oberflächenspannung angewendet (Abb. 18, S. 62). Es zeigt sich vom ersten zum dritten Zyklus eine Abnahme der umschlossenen Hysterese-Fläche, der Kompressibilität und der notwendigen Oberflächenverkleinerung. Der exemplarisch ermittelte Regressionskoeffizient für den offensichtlichen Zusammenhang zwischen der Oberfläche und der Oberflächenspannung in den quasi-statischen Versuchen mit DPPC war 0.5 und war damit ungefähr 25fach größer als in Versuchen mit den löslichen Surfactants.

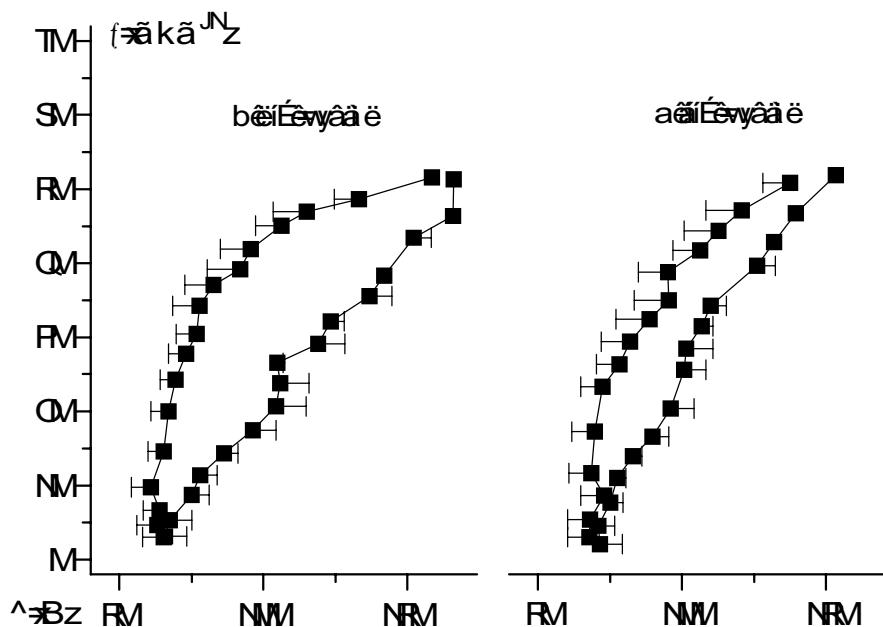


Abb. 18: Quasi-statische Zyklen mit Suspensionen von DPPC

Oberflächenspannung (γ) im ersten (links) und dritten Zyklus (rechts) in Abhängigkeit von der Oberfläche (A). Dargestellt sind Mittel und Standardabweichung der Oberfläche in Kategorien der Oberflächenspannung von drei Experimenten bei einer Phospholipidkonzentration von 1 mgml⁻¹ DPPC. Die umschlossene Hysterese-Fläche ist im dritten Zyklus geringer als im ersten, während die minimale Oberflächenspannung in beiden Zyklen kleiner als 5 mNm⁻¹ ist. Verschiedene kontinuierliche Abschnitte der Oberflächenspannungs-Oberflächen-Isotherme stellen sich unter Verwendung von DPPC-Suspensionen im Vergleich zu DPPC-Injektionen (Abb. 17, S. 60) ähnlich dar.

8.3.1.3 Dynamische Zyklen

Die Messungen der dynamischen Zyklen umfaßten drei Experimente mit DPPC-Suspensionen der Phospholipidkonzentration 1.0 mgml^{-1} . Die Steuerung erfolgte mit 10 min^{-1} Kompressions-Expansions-Zyklen.

Bei maximaler Oberfläche nahm die Oberflächenspannung bis auf 49 mNm^{-1} zu. Bei minimaler Oberfläche nahm die Oberflächenspannung bis auf 2 mNm^{-1} im zweiten Zyklus ab. Die Veränderungen der Oberflächenspannung in aufeinanderfolgenden Zyklen bei maximaler und minimaler Oberfläche sind in Abb. 19 dargestellt. Die Kompressibilität während der dynamischen Zyklen mit DPPC betrug 0.024 ($0.018\text{--}0.034$) mmN^{-1} im ersten und 0.012 ($0.006\text{--}0.029$) mmN^{-1} im dritten Kompressions-Zyklus. Die Oberflächenkompression, die zum Erreichen der minimalen Oberflächenspannung gesteuert wurde, nahm in aufeinanderfolgenden Zyklen ab (Abb. 24, S. 69).

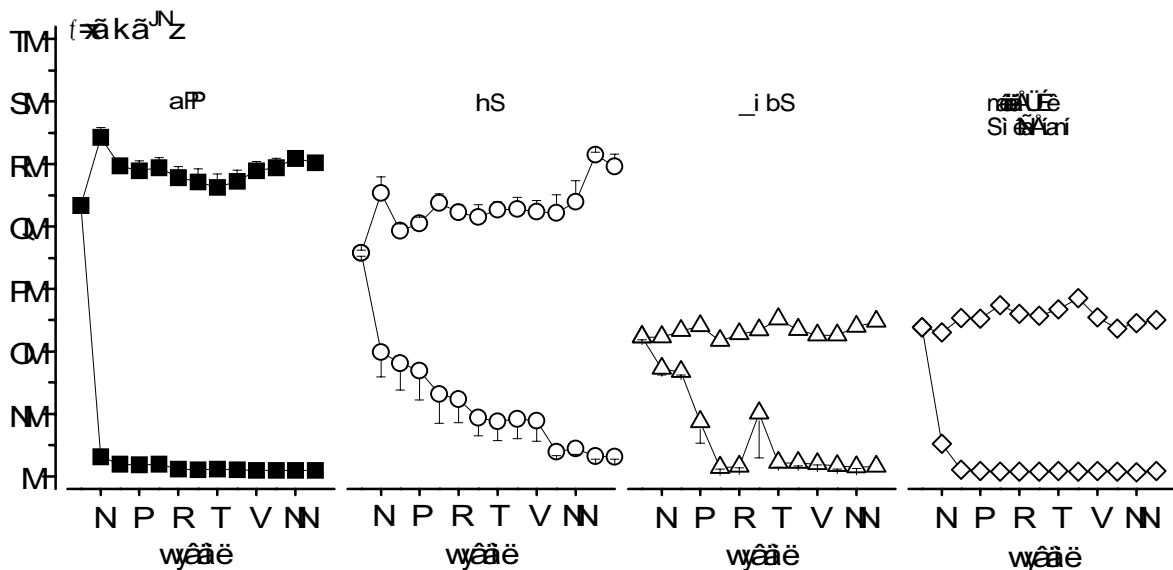


Abb. 19: Dynamische Zyklen verschiedener Surfactant-Suspensionen

Oberflächenspannung (γ) bei maximaler (oberer Kurvenast) und minimaler Oberfläche (unterer Kurvenast). DPPC (■), KS (○), BLES (Δ) und natürlicher Surfactant (\diamond). Mittel und Standardabweichung der Oberflächenspannung von jeweils drei Experimenten in Abhängigkeit vom Zyklus bei einer Phospholipidkonzentration von 1 mgml^{-1} (DPPC, KS, BLES) und 0.5 mgml^{-1} (natürlicher Surfactant). 10 min^{-1} dynamische Zyklen.

Die Spanne der Oberflächenspannung nimmt im Laufe der Zyklen zu. Während schließlich vergleichbare minimale Oberflächenspannungen auftreten, unterscheiden sich die Surfactant deutlich in der Begrenzung des Anstiegs der maximalen Oberflächenspannung.

8.3.2 Künstlicher Surfactant (KS, Exosurf[®])

8.3.2.1 Adsorption

Adsorptionsmessungen wurden mit Suspensionen von KS viermal bei einer Phospholipidkonzentration von 0.2 mgml^{-1} , dreimal bei 1.0 mgml^{-1} und zweimal bei 1.75 mgml^{-1} durchgeführt. Die Halbwertszeit der Senkung der Oberflächenspannung durch Adsorption sowie die Oberflächenspannung nach Erreichen des Adsorptions-Gleichgewichts und die vorgewählte Oberflächenvergrößerung sind in Tab. 10 (S. 65) zusammengefasst. Die Verläufe der Oberflächenspannung während dieser Versuche sind in Abb. 20 wiedergegeben. Die Adsorptionsverläufe verschiedener Konzentrationen von KS unterscheiden sich nur geringfügig und werden von der eingesetzten Konzentration an Phospholipiden kaum beeinflusst.

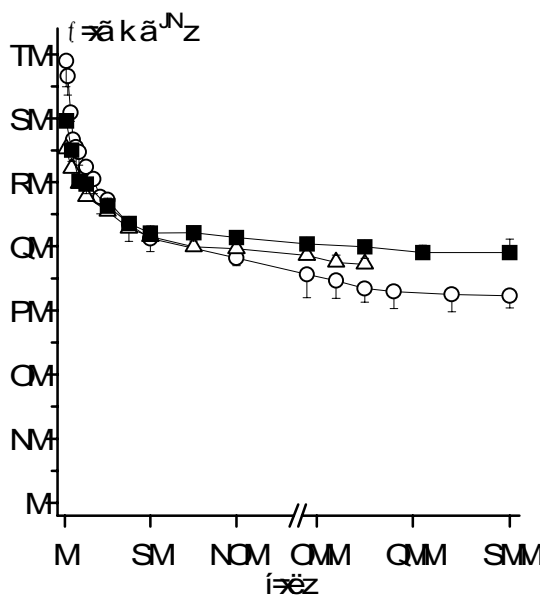


Abb. 20: Adsorptionsverlauf von künstlichem Surfactant

Phospholipidkonzentration 0.2 (O), 1 (Δ) und 1.75 mgml^{-1} (\blacksquare). Mittel und Standardabweichung der Oberflächenspannung (γ) von je drei Experimenten in Abhängigkeit von der Adsorptionsdauer (t). Die Adsorptionsverläufe werden allenfalls geringfügig von der eingesetzten Phospholipidkonzentration beeinflusst.

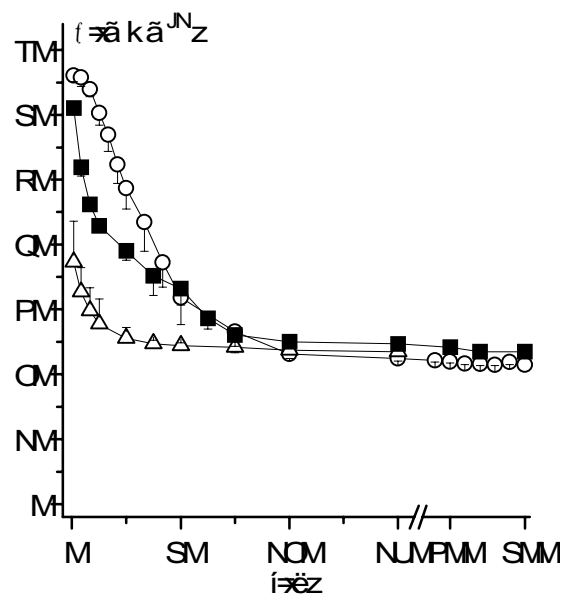


Abb. 21: Adsorptionsverlauf von bovinem Lipid-Extraktions-Surfactant

Phospholipidkonzentration 0.2 (O), 1 (Δ) und 1.75 mgml^{-1} (\blacksquare). Mittel und Standardabweichung der Oberflächenspannung (γ) von je drei Experimenten in Abhängigkeit von der Adsorptionsdauer (t). Die Adsorptionsverläufe unterscheiden sich im wesentlichen lediglich während der initialen Senkung der Oberflächenspannung.

Tab. 10: Adsorptionsverhalten von künstlichem Surfactant

c [mgml ⁻¹]	n	ΔA [%]	$t_{1/2}$ [s]	γ_{\min} [mNm ⁻¹]
0.2	4	539±83	22.4±3.8	33.1±3.2
1.0	3	208±1	24.9±4.4	38.1±1.1
1.75	2	204±1	16.2±4.2	40.3±1.1

Phospholipidkonzentration von KS (c), Anzahl der Versuche (n), gesteuerte Vergrößerung der Oberfläche der Luftblasen (ΔA). Oberfläche initial 100 %. Halbwertzeit der Adsorption ($t_{1/2}$) und Gleichgewichts-Oberflächenspannung (γ_{\min}) bestimmt durch Anpassung an exponentielle Verfallsfunktion.

8.3.2.2 Quasi-statische Zyklen

Quasi-statische Zyklen wurden mit Suspensionen von KS neunmal bei einer Phospholipidkonzentration von 0.8 mgml⁻¹ und fünfmal bei 1.0 mgml⁻¹ durchgeführt. Die ersten drei aufeinanderfolgenden Zyklen aller Experimente waren hinsichtlich der Veränderungen der Oberflächenspannungen qualitativ gleich. In Experimenten bei einer Phospholipidkonzentration von 1.0 mgml⁻¹ waren die minimalen und maximalen Oberflächenspannungen im ersten Zyklus 8.5 mNm⁻¹ und 41.6 mNm⁻¹ und die entsprechenden Oberflächen 51 % und 179 %. Die Hysterese-Flächen betragen im ersten Zyklus 5.8 und im dritten Zyklus 5.4 cm²mNm⁻¹. Der Ablauf der zugehörigen quasi-statischen Kompressions-Expansions-Isothermen des zweiten Zyklus ist in Abb. 22 (S. 66) dargestellt.

8.3.2.3 Dynamische Zyklen

Dynamische Zyklen wurden viermal mit Suspensionen von KS bei einer Phospholipidkonzentration von 1.0 mgml⁻¹ durchgeführt. Die Steuerung der dynamischen Zyklen erfolgte mit 10 min⁻¹ Kompressions-Expansions-Zyklen. Die Abnahme der Oberflächenspannung in aufeinanderfolgenden Zyklen bei jeweils maximaler und minimaler Oberfläche ist in Abb. 19 (S. 63) wiedergegeben.

Die minimale Oberflächenspannung nahm ab und war 4 mNm⁻¹ ab dem zehnten Zyklus. Bei maximaler Oberfläche war die Oberflächenspannung 43 mNm⁻¹. Die Kompressibilität war 0.183 (0.021–0.341) mmN⁻¹ im ersten Kompressions-Zyklus und 0.009 (0.004–0.024) mmN⁻¹ im zehnten Zyklus.

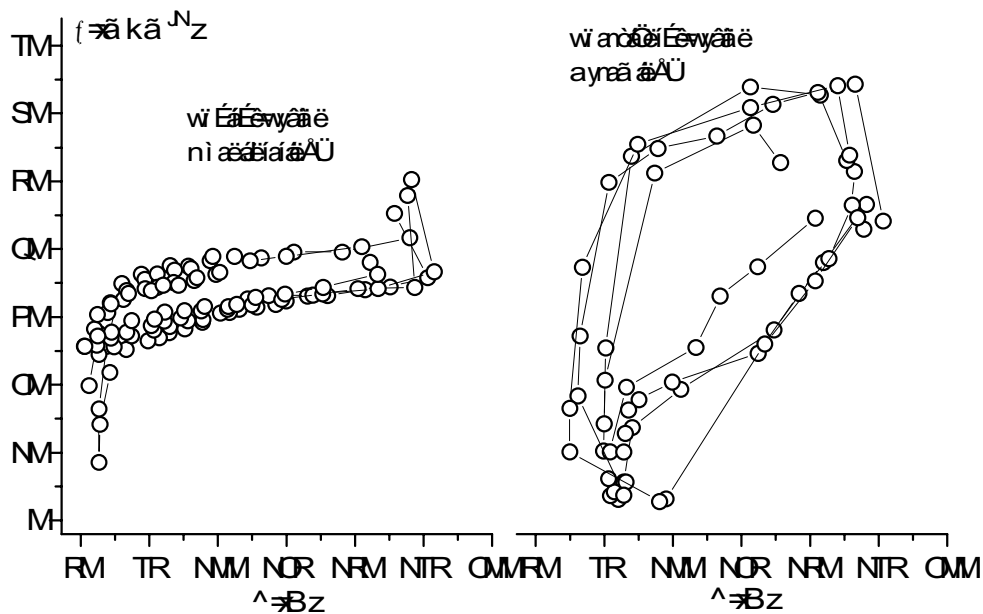


Abb. 22: Vergleich zwischen quasi-statischen und dynamischen Zyklen mit künstlichem Surfactant

Links: zweiter Zyklus der quasi-statischen Zyklen; rechts: zwanzigster Zyklus der dynamischen Zyklen. Dargestellt ist die Oberflächenspannung (γ) in Abhängigkeit von der Oberfläche (A). Meßwerte von insgesamt sieben Experimenten bei einer Phospholipidkonzentration von 1 mgml^{-1} . Die Abbildung zeigt, daß während dynamischer Zyklen eine größere Hysteresefläche und niedrigere minimale Oberflächenspannung im Vergleich zu den anfänglichen quasi-statischen Zyklen auftritt.

Die notwendige Oberflächenkompression für die minimale Oberflächenspannung wurde mit wiederholten Kompressions-Zyklen kleiner (Abb. 24, S. 69).

Die Veränderungen der Oberflächenspannung in Abhängigkeit von der Oberfläche in quasi-statischen Zyklen und in dynamischen Zyklen sind für den zweiten und zwanzigsten Zyklus in Abb. 22 gegenübergestellt.

8.3.2.4 Stabilität

Stabilitätsmessungen wurden achtmal mit Suspensionen von KS bei einer Phospholipidkonzentration von 0.8 mgml^{-1} durchgeführt. Die Oberfläche wurde den dynamischen Zyklen vergleichbar schnell komprimiert (entsprechend 10 min^{-1} Zyklen), aber erst nach 30 s Beobachtungsdauer expandiert.

In repräsentativen Versuchen wurde die Oberflächenspannung während der Oberflächenkompression und der anschließenden Beobachtungsdauer gemessen und in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt (Abb. 23, S. 67).

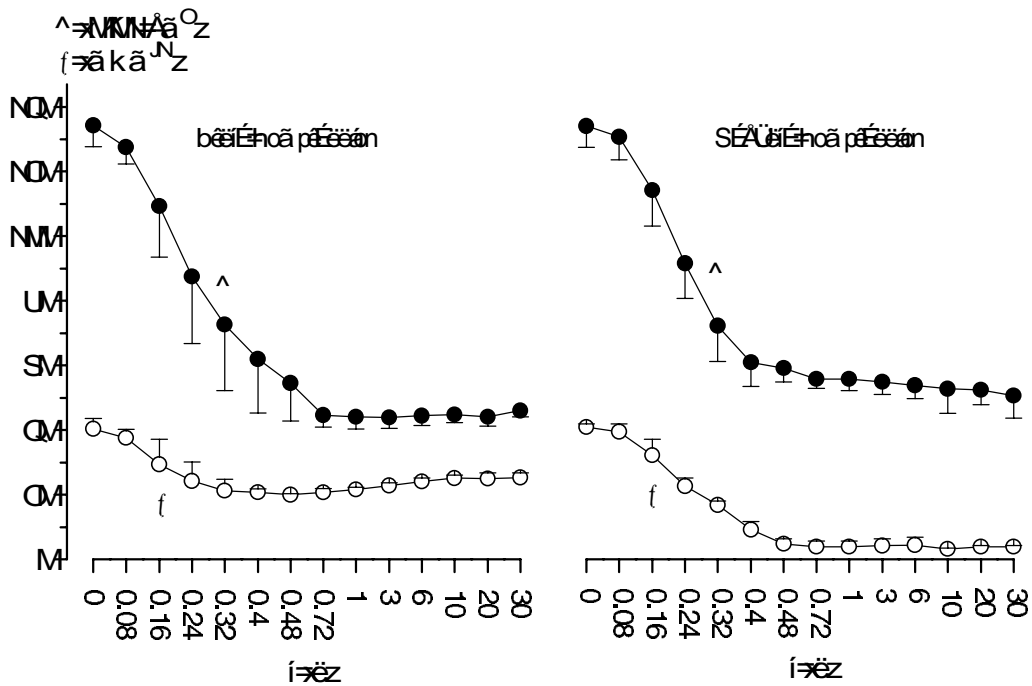


Abb. 23: Stabilität von künstlichem Surfactant

Oberflächenspannung (γ , \circ) und Blasenoberfläche (A , \bullet) in Abhängigkeit vom Beobachtungszeitpunkt (t) während der ersten (links) und sechsten Kompression (rechts). Mittelwerte und Standardabweichung von jeweils drei Experimenten bei einer Phospholipidkonzentration von 0.8 mgml^{-1} . Abszisse nicht-linear.

In der linken Abbildung ist der spontane Anstieg der Oberflächenspannung während einer ab 0.72 s minimalen Oberfläche dargestellt, während nach mehreren Zyklen (rechte Abbildung) eine kontinuierliche Abnahme der Oberfläche bei konstanter minimaler Oberflächenspannung auftritt. Die gemessenen Verläufe unterschieden sich lediglich in der Anzahl, nicht aber in Art oder Ausmaß der vorangegangenen Kompressions-Expansions-Zyklen.

Im ersten Kompressionszyklus wurde die minimale Oberfläche nach 0.72 s erreicht, während die Oberflächenspannung bereits nach 0.4 s minimal ist und anschließend ansteigt. Der Anstieg der Oberflächenspannung ist $13.2 \text{ mNm}^{-1}\text{min}^{-1}$ unter Verwendung einer linearen Regression. Im sechsten Zyklus bleibt die Oberflächenspannung ab 0.48 s minimal, während die Oberfläche kontinuierlich sinkt, nach der bis 0.4 s gesteuerten Oberflächenveränderung um 8 \%min^{-1} .

8.3.3 Boviner Lipid-Extraktions-Surfactant (BLES, Alveofact[®])

8.3.3.1 Adsorption

Adsorptionsmessungen mit Suspensionen von BLES wurden fünfmal bei einer Phospholipidkonzentration von 0.2 mgml^{-1} , dreimal bei 1.0 mgml^{-1} und zweimal bei 1.75 mgml^{-1} durchgeführt. Die Versuche mit niedriger Konzentration waren gut reproduzierbar, während unter der Verwendung hoher Konzentrationen die Beobachtungsspanne nicht erreicht wurde oder zusätzliche Luftblasen die Auswertung störten. Die Messung der Adsorption bei unterschiedlichen Oberflächenvergrößerungen der Luftblasen in Alveofact zeigte die in Tab. 11 dokumentierten, stark unterschiedlichen Gleichgewichts-Oberflächenspannungen und Halbwertzeiten der Oberflächenspannungs-Senkung. Der Verlauf der Adsorption in den Versuchen ist in Abb. 21 (S. 64) dargestellt.

Tab. 11: Adsorptionsverhalten von bovinem Lipid-Extraktions-Surfactant

c [mgml ⁻¹]	n	ΔA [%]	$t_{1/2}$ [s]	γ_{\min} [mNm ⁻¹]
0.2	5	518±117	27.6±8.8	20.4±1.0
1.0	3	211±3	7.4±2.4	24.4±0.4
1.75	2	214±5	24.6±6.2	24.2±0.8

Phospholipidkonzentration (c) von BLES, Anzahl der Versuche (n) und gesteuerte Vergrößerung der Oberfläche der Luftblasen (ΔA). Oberfläche initial 100 %. Halbwertzeit der Adsorption ($t_{1/2}$) und Gleichgewichts-Oberflächenspannung (γ_{\min}) bestimmt durch Anpassung an exponentielle Verfallsfunktion.

8.3.3.2 Quasi-statische Zyklen

Quasi-statische Zyklen wurden mit Suspensionen von BLES dreimal bei einer Phospholipidkonzentration von 0.8 mgml^{-1} und fünfmal bei 1.0 mgml^{-1} durchgeführt. Die aufeinanderfolgenden quasi-statischen Zyklen unterschieden sich im Verlauf der Versuche hinsichtlich Veränderungen der Oberflächenspannungen nur gering. Im ersten Zyklus konnte eine Oberflächenspannung unter 15 mNm^{-1} nicht erzielt werden. Der Verlauf des zweiten Zyklus ist in Abb. 25 (S. 70) wiedergegeben. In Versuchen bei 1.0 mgml^{-1} Phospholipidkonzentration betragen die Hystereseflächen im ersten Zyklus 8.6 und im vierten Zyklus $6.1 \text{ cm}^2 \text{ mNm}^{-1}$.

8.3.3.3 Dynamische Zyklen

Dynamische Zyklen wurden mit Suspensionen von BLES viermal bei einer Phospholipidkonzentration von 1 mgml^{-1} durchgeführt. Die Steuerung der dynamischen Zyklen erfolgte mit 10 min^{-1} Kompressions-Expansions-Zyklen. Zwischen der minimalen und maximalen Oberfläche zeigte sich eine zunehmende Spanne der Oberflächenspannung. Die minimale Oberflächenspannung ab dem fünften Zyklus war 2 mNm^{-1} und die maximale Oberflächenspannung 23 mNm^{-1} .

Die Kompressibilität war 0.046 ($0.028\text{--}0.215$) mmN^{-1} im ersten Kompressions-Zyklus und 0.020 ($0.019\text{--}0.021$) mmN^{-1} im zwanzigsten Zyklus. Die notwendige Oberflächenkompression zum Erreichen der minimalen Oberflächenspannung wurde mit wiederholten Zyklen kleiner (Abb. 24).

Die Veränderung der Oberflächenspannung in Abhängigkeit von der Oberfläche in dynamischen Zyklen und quasi-statischen Zyklen sind für den zweiten und zwanzigsten Zyklus in Abb. 25 (S. 70) gegenübergestellt.

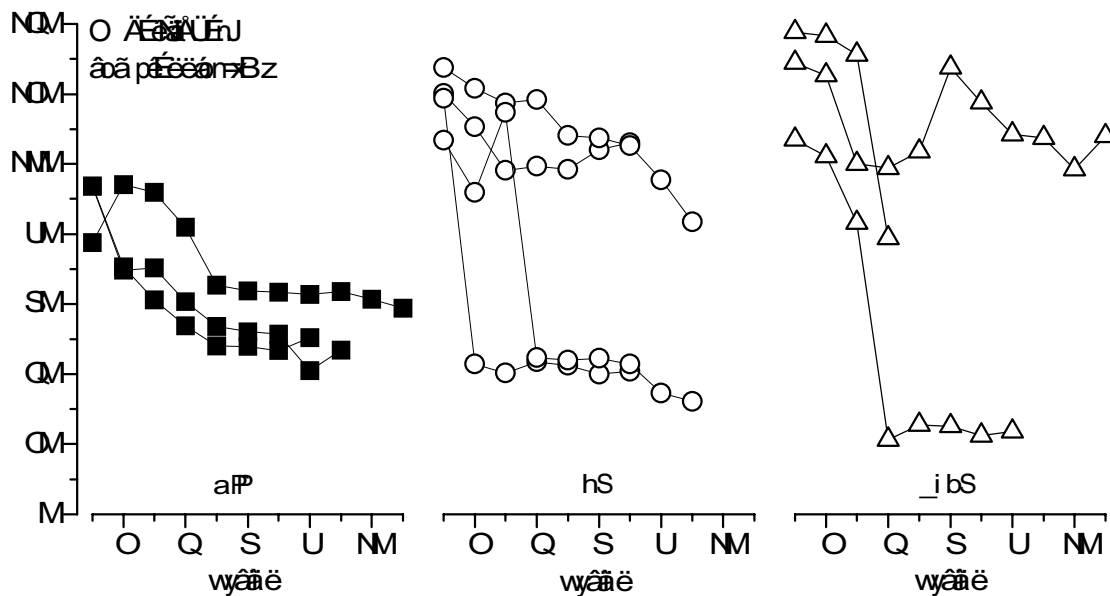


Abb. 24: Oberflächenkompression während dynamischer Zyklen

Oberflächenkompression ($A_{\max} - A_{\min}$) in aufeinanderfolgenden Zyklen unter Verwendung von DPPC (■), KS (○) und BLES (△). Oberfläche A_{\max} bestimmt bei maximaler Blasenexpansion, A_{\min} gemessen bei minimaler Oberflächenspannung.

Während der gleichbleibend gesteuerten Abläufe der Versuche ist eine Abnahme der Spanne der Blasenoberfläche zu beobachten, die der Abnahme der notwendigen Oberflächenkompression zum Erreichen der minimalen Oberflächenspannung entspricht.

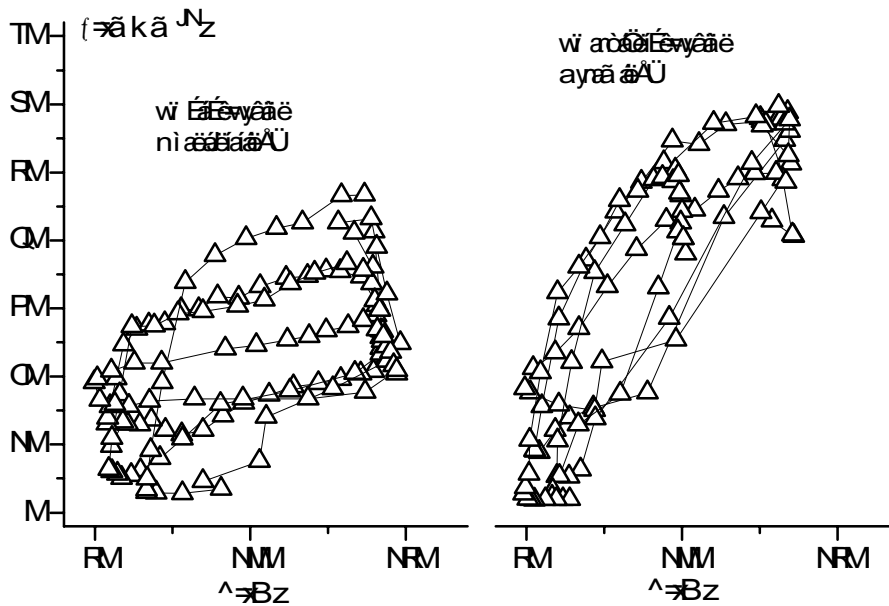


Abb. 25: Vergleich zwischen quasi-statischen und dynamischen Zyklen mit bovinem Lipid-Extraktions-Surfactant

Links: zweiter Zyklus der quasi-statischen Zyklen; rechts: zwanzigster Zyklus der dynamischen Zyklen. Oberflächenspannung (γ) in Abhängigkeit von der Oberfläche (A). Meßwerte von insgesamt neun Experimenten bei einer Phospholipidkonzentration von 1 mgml^{-1} .

Die Abbildung zeigt, daß während quasi-statischer und dynamischer Zyklen eine vergleichbar große Hystereseffläche bei ähnlicher minimaler Oberflächenspannung auftritt. Im Vergleich zu KS (Abb. 22, S. 66) zeigt BLES in anfänglichen quasi-statischen Zyklen eine niedrigere minimale Oberflächenspannung (links). Die maximale Oberflächenspannung (rechts) entspricht derjenigen von DPPC und KS, jedoch nimmt die Oberflächenspannung mit zunehmender Oberfläche wieder ab (Abb. 19, S. 63).

Die Ergebnisse dieser Versuche mit unlöslichen Surfactants zeigten zusammenfassend eine unterschiedliche biophysikalische Oberflächenaktivität und Oberflächenspannung in unterschiedlichen Adsorptionskinetiken, quasi-statischen und dynamischen Zyklen. Niedrige Oberflächenspannungen ($< 5 \text{ mNm}^{-1}$) konnten nicht in allen Versuchen erreicht werden; plateauartig konstante Oberflächenspannungen wie bei Überkompressionen waren auch bei großen Oberflächenveränderungen nicht zu beobachten.

8.4 Lungenschädigung und natürlicher Surfactant

Nachdem zunächst lösliche und verschiedene unlösliche Surfactants mit dem Captive-Bubble-Surfactometer gemessen wurden, kam schließlich der durch eigene Präparation gewonnene Surfactant aus einem Lungenschädigungs-Modell zur Untersuchung. Die damit verbundene Fragestellung war, ob und in welcher Weise sich durch eine Silica-induzierte Lungenschädigung eine Änderung der biophysikalischen Eigenschaften des natürlichen Surfactants ergibt.

Zunächst wurden die Lungen makroskopisch beurteilt und das Feuchtgewicht bestimmt. Die Präparation des Surfactants erfolgte dann durch Lungenlavage, Ultrazentrifugation und standardisierte Resuspension (Kap. 7.3). Der Surfactant wurde nach unterschiedlicher Schädigungsdauer sowohl mit verschiedenen Methoden biochemisch als auch im Captive-Bubble-Surfactometer biophysikalisch untersucht. Dabei wurden vergleichende Bestimmungen von Protein-, Phosphorgehalt, Phospholipid-Analysen sowie Adsorptionsmessungen, dynamische Zyklen und Stabilitätsmessungen durchgeführt.

8.4.1 Biochemische Charakterisierung

Bei 29 Wistar-Ratten wurde eine Silica-Suspension zur Erzeugung einer Lungenschädigung intratracheal verabreicht. Alle Tiere überlebten den jeweils vorgesehenen Beobachtungszeitraum von maximal 28 Tagen. Bei 20 entnommenen Lungen bestand makroskopisch eine charakteristische graue Verfärbung und Konsistenzvermehrung der Lunge. Neun Lungen wiesen makroskopisch keine Lungenschädigung auf und wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Die Kontrollgruppe umfaßte 17 Wistar-Ratten; die zugehörigen Ergebnisse werden zum Vergleich als null Tage Lungenschädigung dargestellt.

Das Gewicht aller Tiere zu Versuchsbeginn war 220 ± 8 g. Die Tiere nach Silica-Instillation wurden nach 7 d (vier Tiere), 14 d (vier), 21 d (fünf) und 28 d (sieben) zur Organentnahme getötet. Die Tiere der Kontrollgruppe wurden nach kurzer Käfighaltung (entsprechend null Tagen Lungenschädigung) zur Organentnahme getötet. Das Feuchtgewicht der entnommenen Lungen nahm während der Dauer der Lungenschädigung kontinuierlich zu (Tab. 12, S. 72).

Aus den gewonnenen Lavagen der Rattenlungen mit und ohne Schädigung wurden Phospholipidanalysen mit HPLC vorgenommen und die Phosphat- und Proteinkonzentration bestimmt. Einen Überblick über die biochemischen Charakteristika dieser unkonzentrierten Proben gibt Tab. 12 (S. 72). Für die biophysikalischen Messungen mit dem Captive-Bubble-Surfactometer mußten die Lavagen konzentriert werden; ob dadurch eine Verschiebung der Verteilung der Phospho-

lipidanteile entsteht, wurde in konzentrierten Proben durch zusätzliche Phospholipidanalysen mit HPLC untersucht (Tab. 14, S. 73).

In unkonzentrierten Proben nahm die Phosphatkonzentration während der Dauer der Lungenschädigung kontinuierlich zu und erreichte nach 28 Tagen die dreißigfache Ausgangskonzentration. Die Phospholipidanalyse ergab nach 28 Tagen Lungenschädigung eine siebzehnfach höhere Gesamtphospholipidkonzentration als bei Kontrollen. Das einheitslose Verhältnis der gewichtsbezogenen Konzentration von Phospholipid zu Phosphat betrug 22.5 unter Verwendung einer linearen Regression (46 Meßwerte, $R^2=0.982$). In den konzentrierten Proben war die Phosphatkonzentration abhängig von der durchgeführten Konzentrierung und wurde lediglich zur standardisierten Resuspendierung der Proben bestimmt.

In den unkonzentrierten Proben erreichte die Proteinkonzentration nach 7 Tagen Lungenschädigung einen Höchstwert ($874 \mu\text{gml}^{-1}$), das Achtzehnfache der Ausgangskonzentration ($46 \mu\text{gml}^{-1}$).

Tab. 12: Biochemische Charakteristika von Lungen und Lungenlavage-Proben im Verlauf einer Silica-induzierten Lungenschädigung

t [d]	n	M [g]	n	P [μgml^{-1}]	n	PL [μgml^{-1}]	n	E [μgml^{-1}]	E:P
0	11	2.2±0.4	11	1.2±0.2	16	21.4±3	6	45.5±8	39
7	2	5.3±1.1	4	11.7±3.3	4	111.5±53	4	857.8±229	73
14	4	6.0±1.2	4	25.6±7.3	4	210.5±43	4	864.7±161	34
21	3	7.6±2.1	5	32.1±13.7	5	309.4±141	5	785.3±141	25
28	8	8.2±2.1	4	35.6±10.8	8	368.9±138	8	873.7±151	25

Dauer der Silica-induzierten Lungenschädigung (t) und Anzahl der Meßwerte (n). Feuchtgewicht der Lungen (m). Phosphatkonzentration (P), Phospholipidkonzentration (PL), Proteinkonzentration (E) und Verhältnis von Protein- zu Phosphatkonzentration (E:P) in unkonzentrierten Lungenlavage-Proben.

Die Phospholipidanalysen von unkonzentrierten Proben sind in Tab. 13 (S. 73) und von konzentrierten Proben in Tab. 14 (S. 73) zum Vergleich wiedergegeben. Während der Dauer der Lungenschädigung trat in unkonzentrierten Proben eine deutliche Abnahme des Anteils von PG und PS und eine deutliche Zunahme von PI und PC auf. In konzentrierten Proben sind diese Veränderungen entsprechend nachzuweisen, jedoch etwas geringer (Abb. 27, S. 74). Für PE und SP ergaben sich keine offensichtliche Verschiebungen der relativen Anteile in Abhängigkeit von der Dauer der Lungenschädigung.

Tab. 13: Verteilung der Phospholipide in unkonzentrierten Lungenlavage-Proben im Verlauf einer Silica-induzierten Lungenschädigung

t [d]	n	PG	PE	PI	PS	PC	SP
0	16	21.4	2.7	3.0	1.2	70.2	1.5
7	4	7.2	4.7	8.2	0.9	75.5	3.4
14	4	4.1	3.0	7.0	0.1	83.9	1.7
21	5	3.9	3.0	6.4	0.2	85.1	1.5
28	8	4.5	3.1	6.6	0.1	83.9	1.8

Tab. 14: Verteilung der Phospholipide in konzentrierten Lungenlavage-Proben im Verlauf einer Silica-induzierten Lungenschädigung

t [d]	n	PG	PE	PI	PS	PC	SP
0	2	21.9	2.3	2.0	0.5	72.4	0.9
7	2	6.6	3.8	6.5	0	81.0	2.0
14	2	4.7	2.2	4.2	0.2	87.5	1.2
21	2	4.7	1.9	4.6	0	87.5	1.2
28	2	3.6	2.5	3.3	0.2	89.1	1.3

Masseanteile der unterschiedlichen Phospholipidklassen von natürlichem Surfactant in Abhängigkeit von der Dauer (t) der Lungenschädigung. Angabe in Prozent. Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SP) .

Zusammenfassend traten im Vergleich zwischen den unkonzentrierten und konzentrierten Proben zu keinem Zeitpunkt Veränderungen auf, die außerhalb der Schwankungsbreite der Phospholipidanalyse durch HPLC lagen.

8.4.2 Biophysikalische Eigenschaften des natürlichen Surfactant

Nachdem keine wesentliche Verschiebung der Verteilung der Phospholipidanteile durch das hier eingesetzte Konzentrierungsverfahren nachzuweisen war, wurden Messungen der biophysikalischen Oberflächenaktivität des natürlichen Surfactant nur an konzentrierten Proben durchgeführt. Insgesamt wurden 22 Proben mit dem Captive-Bubble-Surfactometer untersucht. Zur Untersuchung der Kontrollen wurden jeweils vier konzentrierte Proben wegen der niedrigen Phospholipidkonzentration zu drei untersuchbaren Proben zusammengefaßt. Anhand der gemessenen Phosphatkonzentration erfolgte die Resuspendierung der konzentrierten Proben in Standardpuffer (Endvolumen 2–5 ml) zu einer errechneten Phospholipidkonzentration von 0.5 mgml^{-1} .

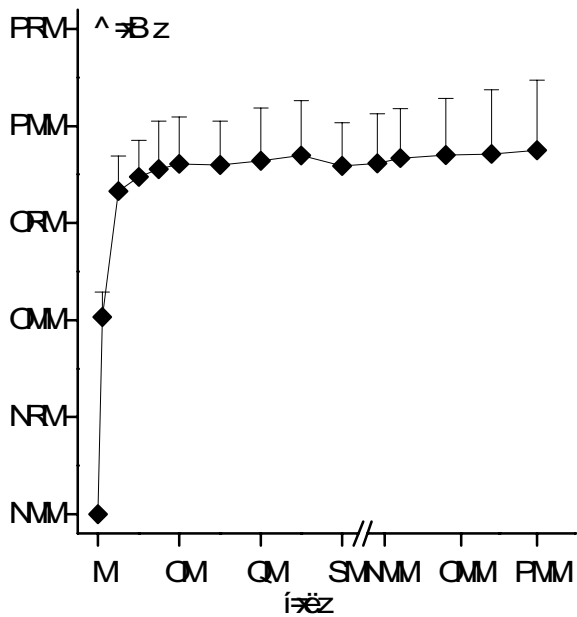


Abb. 26: Steuerung der Oberflächenexpansion in Adsorptionsversuchen

Oberfläche (A) der Luftblasen in Abhängigkeit von der Zeitdauer (t) der gesteuerten Expansion in Adsorptionsversuchen mit natürlichem Surfactant. Mittelwert und Standardabweichung aus 14 Experimenten mit konzentrierten Proben aus natürlichem Surfactant.

Die Expansion der Luftblase war nach 10 s annähernd vollständig. Die Abbildung zeigt, daß die Expansion in Adsorptionsversuchen ausreichend gut reproduzierbar war (Variationskoeffizient 9 %).

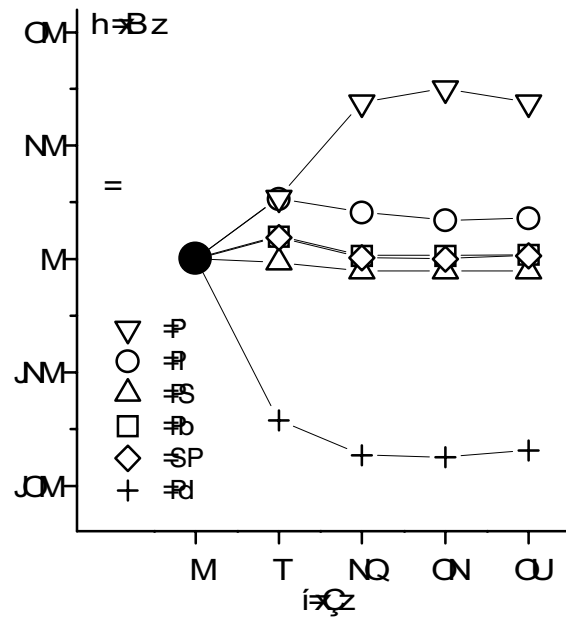


Abb. 27: Zeitliche Veränderung der Verteilung der Phospholipide

Prozentuale Veränderung der Masseanteile (K) in konzentrierten Proben aus natürlichem Surfactant gegenüber dem Ausgangswert (●) in Abhängigkeit von der Dauer der Lungenschädigung (t). Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylethanolamin (PE), Sphingomyelin (SP), Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylglycerol (PG).

Eine wesentliche Zunahme des Masseanteils ist zeitabhängig bei PC und geringer auch bei PI zu beobachten, während eine Abnahme von PG auftritt.

Es wurden pro Probe eine Adsorptionsmessung über 5 Minuten, ein Versuch mit mindestens 50 dynamischen Zyklen und anschließend eine Stabilitätsmessung über 30 Minuten durchgeführt.

8.4.2.1 Adsorptionsmessung

In allen Experimenten wurde die Adsorption durch eine Oberflächenvergrößerung auf 282 ± 24 % (Abb. 26) ausgelöst. Die Halbwertszeit der Vergrößerung war 1.4 s; das Volumen der Luftblasen zu Versuchsbeginn war 28.8 ± 4.5 μl . Nach Einstellung einer Oberflächenspannung von 23.4 ± 2.1 mNm^{-1} zu Beginn aller Versuche erfolgte die Expansion der Blase, wobei eine maximale Oberflächenspannung von 35.5 ± 7.6 mNm^{-1} gemessen wurde. Danach stellte sich erneut innerhalb einer meßbaren Zeitspanne ein Adsorptions-Gleichgewicht ein (23.9 ± 1.7 mNm^{-1}).

Tab. 15: Adsorptionsmessungen mit natürlichem Surfactant im Verlauf einer Silica-induzierten Lungenschädigung

t [d]	n	$t_{1/2}$ [s]	γ^* [mNm ⁻¹ min ⁻¹]
0	2	7.7 (5–10.3)	57
7	3	7.5 (6.6–38.7)	118
14	3	5.2 (2–8.8)	177
21	3	4.2 (1.9–4.3)	161
28	3	2.5 (1.8–2.5)	231

Dauer der Lungenschädigung (t) und Anzahl (n) der Versuche. Mediane Halbwertzeiten ($t_{1/2}$) der Adsorption und Geschwindigkeiten der Veränderungen der Oberflächenspannung (γ^* , vgl. Tab. 17, S. 77) während der Adsorptionsmessungen.

Die gemessenen Spannweiten der Oberflächenspannungen waren von der Dauer der Lungenschädigung unabhängig. Im Verlauf der Lungenschädigung nahmen die Halbwertzeiten der Adsorption von 7.7 s auf 2.5 s ab (Tab. 15).

Die medianen Geschwindigkeiten der Abnahme der Oberflächenspannung während der Adsorptionsmessungen wurden zum Vergleich mit den Stabilitätsmessungen berechnet.

8.4.2.2 Dynamische Zyklen

In den 14 Experimenten unter Verwendung von dynamischen Zyklen (10 min⁻¹) zeigten die meisten der untersuchten Proben eine Veränderung des Ablaufs der Kompressions-Expansions-Zyklen. Die minimale Oberflächenspannung war 19 mNm⁻¹ bei Proben von Kontrolltieren ohne Lungenschädigung und 1 mNm⁻¹ bei allen anderen Proben und wurde jeweils nach acht und zwei Kompressionen erreicht (Tab. 16, S. 77). Die maximale Oberflächenspannung war 25.8 mNm⁻¹ nach dem ersten Kompressionszyklus. Die Spannweite der Oberflächenspannungen in Abhängigkeit vom Kompressionszyklus für alle Proben mit Lungenschädigung war 20 mNm⁻¹ und ist in Abb. 19 (S. 63) dargestellt. Die Hysterese-Flächen betragen durchschnittlich im ersten Zyklus 6.1 und im dritten Zyklus 3.1 cm²mNm⁻¹. Während des zehnten Kompressionszyklus ist die notwendige Oberflächenverkleinerung bei Proben nach Lungenschädigung geringer als bei Proben von Kontrolltieren. Den Ablauf der Kompressions-Expansions-Zyklen in Abhängigkeit von der Dauer der Lungenschädigung ist in Abb. 28 (S. 76) für Proben von Kontrollen und in Abb. 29 (S. 76) nach 28 Tagen Lungenschädigung dargestellt.

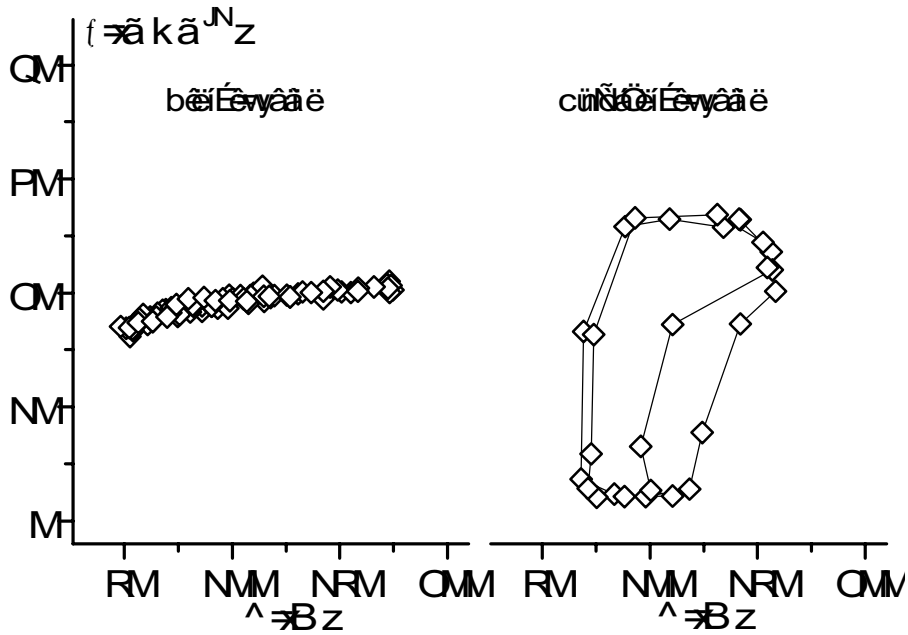


Abb. 28: Natürlicher Surfactant von Kontrolltieren

Oberflächenspannung (γ) im ersten (links) und fünfzigsten (rechts) dynamischen Zyklus in Abhängigkeit von der Oberfläche (A) in fünf Experimenten bei einer Phospholipidkonzentration von 0.5 mgml^{-1} . In anfänglichen Zyklen ist die Oberflächenaktivität nicht ausreichend, um eine niedrige minimale Oberflächenspannung zu erreichen. In fortgeschrittenen Zyklen ist dann die Oberflächenspannung minimal und die Hystereseffläche jedoch relativ groß.

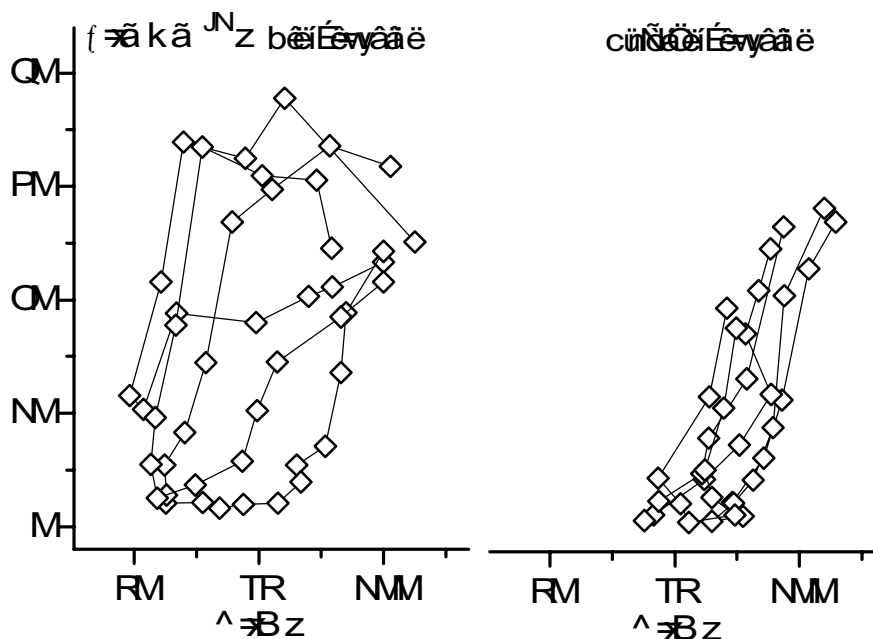


Abb. 29: Natürlicher Surfactant nach 28 Tagen Lungenschädigung

Versuchsbedingungen in sechs Experimenten entsprechend Abb. 28. Die Oberflächenaktivität dieses Surfactants ist hinsichtlich der minimalen Oberflächenspannung, Kompressibilität und Hystereseffläche bei Lungenschädigung größer als bei Kontrollen (Abb. 28).

Tab. 16: Dynamische Zyklen mit natürlichem Surfactant im Verlauf einer Silica-induzierten Lungenschädigung

t [d]	n	z	γ_{\min} [mNm ⁻¹]	ΔA [%]	k [mmN ⁻¹]
0	2	8	19	52	-
7	3	1	1	22	0.005
14	3	3	1	35	0.007
21	3	3	1	35	0.119
28	3	1	1	30	0.004

Dauer der Lungenschädigung (t) und Anzahl (n) der Versuche. Anzahl der Zyklen (z) zum Erreichen der minimalen Oberflächenspannung (γ_{\min}) unter Verwendung dynamischer Zyklen. Mittelwerte der Oberflächenkompression (ΔA) und Kompressibilität (k) bei 15 mNm⁻¹ während des zehnten Kompressionszyklus.

Die fortgeschrittenen dynamischen Zyklen unterscheiden sich nur unwesentlich (vgl. Abb. 28 und Abb. 29, S. 76) und zeigen keine deutliche Abhängigkeit von der Dauer der Lungenschädigung. Die Werte für die Kompressibilität der Oberfläche sind im Vergleich zu anderen getesteten Surfactants niedrig (Tab. 16).

8.4.2.3 Stabilitätsmessungen

In allen Experimenten wurden die Stabilitätsmessungen im Anschluß an die dynamischen Zyklen durchgeführt. Für diese Messungen wurde der Systemdruck auf 100 kPa eingestellt und die Veränderungen der Luftblasen während ungefähr 30 min registriert.

Tab. 17: Stabilität von natürlichem Surfactant im Verlauf einer Silica-induzierten Lungenschädigung

t [d]	n	γ^* [mNm ⁻¹ min ⁻¹]	V^* [μ lmin ⁻¹]	A^* [%min ⁻¹]
0	2	0.015	-0.15	-0.7
7	3	0.019	-0.11	-1.1
14	3	-0.005	-0.13	-0.5
21	3	-0.001	-0.14	-1.0
28	3	0.011	-0.07	-0.6

Dauer der Lungenschädigung (t) und Anzahl (n) der Versuche. Mediane Geschwindigkeiten der Veränderungen der Oberflächenspannung (γ^*), des Volumens (V^*) und der Oberfläche (A^*) der Luftblase während der Stabilitätsmessungen.

Die Stabilität der Luftblase wurde als zeitabhängiger Anstieg der Oberflächenspannung gemessen und betrug im Mittel $0.01 \text{ mNm}^{-1}\text{min}^{-1}$. Die Stabilität ist nicht erkennbar von der Lungenschädigung abhängig (Tab. 17, S. 77). Der mittlere zeitabhängige Volumenverlust der Luftblase betrug in 30 min $4 \mu\text{l}$. Die Oberfläche nahm während der Stabilitätsmessungen im Mittel um $0.7 \%\text{min}^{-1}$ ab.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung des natürlichen Surfactants zeigen die biochemischen Veränderungen der Lungenlavagen in Abhängigkeit von der Dauer der Silica-induzierten Schädigung und die vergleichsweise geringen Unterschiede in den biophysikalischen Messungen. Der natürliche Surfactant zeigte bei relativ niedriger Phospholipidkonzentration eine unbeeinträchtigte und hohe biophysikalische Oberflächenaktivität.

9 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Aufbau eines eigenen Captive-Bubble-Surfactometers beschrieben und dessen Einsatz zur Testung biophysikalischer Oberflächenaktivität verschiedener biologisch relevanter Substanzen gezeigt.

Dabei wurde die Oberflächenspannung als grundlegende Eigenschaft von Oberflächen ausgenutzt, die der Verformung einer kugelförmigen Luftblase entgegensteht. Das aufgebaute Captive-Bubble-Surfactometer wurde zur vergleichenden Testung von wasserlöslichem Surfactant, unlöslichen und natürlichem Surfactant eingesetzt. Verschiedene biophysikalische Parameter (zeitabhängige und kompressionsabhängige Veränderungen der Oberflächenspannung, Kompressibilität und Hystereseffekte) wurden untersucht, mit denen sich unterschiedliche Surfactants charakterisieren ließen.

Die wesentlichen Untersuchungsinhalte zum Einsatz des Captive-Bubble-Surfactometers wurden in acht Thesen konkretisiert (Kap. 5). Dabei handelte es sich im Einzelnen um (I) den Nachweis der Funktionstüchtigkeit des Captive-Bubble-Surfactometers und der Reproduzierbarkeit des Verfahrens, (II) Bestätigung der hohen Oberflächenspannung an der Grenzfläche zwischen Luft und Wasser, (III) Messung konzentrationsabhängig sinkender Oberflächenspannungen bei löslichem Surfactant, (IV) Nachweis der Meßmöglichkeit unlöslicher Surfactants in der Subphase und Grenzfläche, (V) Senkung der Oberflächenspannung durch Adsorption unlöslicher Surfactants, (VI) Nachweis niedriger Oberflächenspannung während quasi-statischer Kompressions-Expansions-Isothermen unlöslicher Surfactants, (VII) Messung verschiedener biophysikalischer Parameter in aufeinanderfolgenden dynamischen Zyklen unlöslicher Surfactants sowie (VIII) die Charakterisierung einer Lungenschädigung durch biochemische Messungen und Beschreibung der biophysikalischen Oberflächenaktivität.

Die Diskussion der Ergebnisse erfolgt entsprechend ihrer Abfolge im Ergebnisteil. Dabei werden die Thesen I unter dem Aspekt der experimentellen Rahmenbedingungen (Kap. 9.1), Thesen II und III als Messung löslicher Surfactants (Kap. 9.2), Thesen IV bis VII als Messung unlöslicher Surfactants (Kap. 9.3) und die These VIII als natürlicher Surfactant der Silica-induzierten Lungenschädigung behandelt (Kap. 9.4). Die benutzte Einteilung der oberflächenaktiven Substanzen in lösliche, unlösliche und natürliche Surfactants gibt die Übersicht über alle mit dem Captive-Bubble-Surfactometer durchgeführten Experimente wieder (Abb. 30, S. 80).

		K	c	t	n_{ADS}	n_{QS}	n_{DYN}	
Surfactant	löslich	Wasser	8.2	0		30		
		Ethanol	8.2	0.05		5		
	0.10				5			
	0.24				5			
	0.48				5			
	0.72				5			
	unlöslich	künstlich	DPPC	8.3.1	0.1		6	
					0.2	10		
					1.0	3	3	3
					1.75	2		
					var. injiz.		19	
		KS	8.3.2	0.2		4		
0.8						9		
1.0				3	5	4		
1.75				2				
natürlich				BLES	8.3.3	0.2		5
	0.8					3		
	1.0	3	5			4		
	RLL	8.4.2	0.2		2			
			0.5	0	2		2	
				0.5	7	3	3	
				0.5	14	3	3	
				0.5	21	3	3	
				0.5	28	3	3	

Abb. 30: Übersicht aller Experimente zur Messung der Oberflächenaktivität

Die Übersicht zeigt links die Einteilung der in dieser Arbeit eingesetzten Surfactants. Die (wasser-) unlöslichen Surfactants werden hier unterteilt (Kap. 7.1) in DPPC (L- α -Dipalmitoylphosphatidylcholin), KS (künstlicher Surfactant, Exosurf), BLES (boviner Lipid-Extraktions-surfactant, Alveofact) und RLL (Surfactant aus Lavagen eines Lungenschädigungsmodells bei Ratten). Rechte Spalten: Kapitel (K) der Ergebnisdarstellung, verwendete Phospholipidkonzentration (c [Volumenanteil] für lösliche, c [mgml⁻¹] für unlösliche Surfactants), Dauer der Lungenschädigung (t [d]), Anzahl der durchgeführten Experimente zur Adsorption (n_{ADS}), unter quasi-statischen (n_{QS}) und dynamischen Kompressions-Expansions-Zyklen (n_{DYN}).

9.1 Experimentelle Rahmenbedingungen

Nachdem das Captive-Bubble-Surfactometer realisiert werden konnte, wurden Messungen durchgeführt, die These I bestätigen sollten: Im Captive-Bubble-Surfactometer läßt sich eine flottierende Luftblase in einer Testflüssigkeit erzeugen, temperieren, komprimieren und expandieren, abbilden und vermessen. In der weitaus größten Zahl der Experimente gelang es ohne weiteres, eine Luftblase eines definierten Volumens unter einer Deckelschicht aus Agarose flottieren zu lassen. Das Volumen der Luftblasen betrug $29 \pm 4 \mu\text{l}$ (Variationskoeffizient

15 %) und stimmte damit gut mit dem eingesetzten Volumen (30 μl) überein, das zu Versuchsbeginn injiziert wurde. Die Luftblase mußte dabei erzeugt werden, ohne ihre Oberfläche bereits vor Versuchsbeginn einer Größenveränderung auszusetzen. Diese Anforderung konnte durch eine bestimmte Injektionstechnik erfüllt werden (Kap. 7.8), mit der die Größe der Oberfläche zu Versuchsbeginn einen Variationskoeffizienten von lediglich 10 % aufwies.

Dabei ist von vornherein zu beachten, in welchem Erwartungsbereich die Oberflächenspannung gemessen werden soll: Die Größe der Luftblase und die abgeleiteten Werte der Blasengeometrie (Höhe und Durchmesser) sind über die verwendeten Approximationen voneinander abhängig (Abb. 15, S. 58; vgl. Abb. 5 in [96]). Die Reproduzierbarkeit der Erzeugung der Luftblasen als methodische Rahmenbedingung kann mit den angegebenen Fehlergrößen für deren Volumen und Oberfläche angenommen werden.

Die Temperaturregelung stellte eine weitere wesentliche Versuchsbedingung zur thermodynamischen Vergleichbarkeit der Ergebnisse dar. Unter Verwendung eines direkten, empfindlichen Temperaturgebers (innerhalb der Probe) und des leistungsstarken (bis 35 W) Heizsystems II wurde innerhalb von wenigen Minuten eine nahezu konstante Temperatur in der Probe erreicht (Abb. 10, S. 54). Die notwendige Materialbewegung zur Verteilung der Heizleistung wurde durch einen gleichbleibend schnell rotierenden (80 Umin^{-1}) Miniatur-Rührer in der Probe sichergestellt. Eine konstante Rührbewegung ist insofern wichtig, als unterschiedliche Rührgeschwindigkeiten die zu beobachtende Oberflächenaktivität beeinflussen können [87]. Die Luftblase im Captive-Bubble-Surfactometer kann damit schnell (3 min) und genau ($\pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$) temperiert werden.

Die Kompression und Expansion der Luftblase wird in dem Meßinstrument durch den hydrostatischen Druck geregelt und dadurch erfolgt indirekt die Regelung der Oberflächengröße der Luftblase. Die erzielbare Verkleinerung der Oberfläche durch Kompression war unterschiedlich und abhängig vom oberflächenaktiven Material (vgl. Abb. 24, S. 69). Die Spanne der steuerbaren, relativen Oberfläche reichte dabei von 50 bis 200 % der Ausgangsgröße. Die Grenzen der Drucksteuerung des Captive-Bubble-Surfactometers sind das Auftreten von zusätzlichen Luftblasen bei Unterdruck und der Volumenverlust bei Überdruck. Unter maximaler Kompression konnten unterschiedlich große minimale Oberflächen durch die biophysikalische Aktivität des jeweiligen Surfactants aufrecht erhalten werden (Abb. 24, S. 69); diese stabilisierten Oberflächen sind Ausdruck der niedrigen Kompressibilität von DPPC-angereicherten Oberflächenfilmen [98].

Für Adsorptionsversuche wurde eine möglichst gleichmäßige Expansion angestrebt, denn die Änderung der Oberfläche bestimmt die Abweichung von der Gleichgewichts-Oberflächenspannung und dadurch die Kinetik der anschließenden Adsorption. Die Reproduzierbarkeit dieser Oberflächenveränderung konnte anhand des Variationskoeffizienten der expandierten Oberfläche (8.5 %; Abb. 26, S. 74) nachgewiesen werden.

Ein wesentlicher Bestandteil des Captive-Bubble-Surfactometers ist das Abbildungssystem, das der Meßwertaufnahme dient und insbesondere eine hohe Bild- und Zeitauflösung bei geringen Abbildungsschwankungen leisten soll. Das hierzu eingesetzte Videosystem (S-VHS) entspricht bezüglich der Bildauflösung (>400 Linien; 440000 Pixel) und der internen Kompensation für Abbildungsschwankungen den Erfordernissen, wobei die zeitliche Auflösung durch die Norm (PAL) begrenzt wird (25 Bilder s^{-1}).

Dieses optisch-elektronische Abbildungssystem arbeitete nicht verzerrungsfrei, sondern bildete ein Quadrat als liegendes Rechteck ab. Das Verhältnis von Höhe zu Durchmesser der Abbildung des Linienquadrats des Eichgitters war 0.938: Auf dem Bildschirm war der Durchmesser (die Breite) über 6 % größer als die Höhe des Quadrats. Diese Verzerrung wurde durch die rechteckigen Bildelemente des CCD-Sensors verursacht und konnte rechnerisch kompensiert werden. Andere Verzerrungen, beispielsweise der Fischaugen-Effekt in Bildecken, führten zu geringfügigen Abbildungsfehlern und waren nicht kompensationsbedürftig. Unter Anwendung einer Eichung und Kompensation konnten die Luftblasen mit diesem System reproduzierbar und vergleichbar abgebildet werden.

Die Oberflächenspannung kann als wesentliche Meßgröße des Captive-Bubble-Surfactometers bezeichnet werden. Die Bestimmung der Oberflächenspannung erfordert dazu eine geeichte Vermessung der Höhe und des Durchmessers der Luftblase in absoluten Streckenmaßen. Dabei können neben groben Fehlern (Verwechslung der Eichung, Änderung der Kameraeinstellungen) systematische und unsystematische Fehler auftreten. Während der grobe Fehler bewirkt, daß das Experiment nicht vergleichbar und reproduzierbar ist, ist der systematische Fehler die unbekannte Differenz zwischen gemessenem und wahren Wert, beispielsweise aufgrund der Restvarianz der verwendeten Approximationen.

Ein unsystematischer Fehler kann durch statistische Fehlerrechnung beschrieben werden und wird hier als Vermessungsfehler der abgebildeten Objekte erfaßt. Der Vermessungsfehler wurde anhand der Wiederholungsmessungen des Eichgitters abgeschätzt, da Luftblasen während der Experimente nur einmalig vermessen wurden. Der maximale Variationskoeffizient der Vermessungen des Eichgitters

(0.4 % oder 1 ± 0.004 Pixel) entspricht damit der maximalen Vermessungsgenauigkeit einer Luftblase während eines Experiments mit Luftblasen.

Als wesentliche Fehlerquelle ist für die Vermessung von Luftblasen die untersucherabhängige Festlegung der Begrenzungen zu vermuten, deren Grauwert-Kontraste sehr unterschiedlich sein können. Die richtige Abgrenzung der Luftblase hängt von der Art und Konzentration der Phospholipide ab, die die umgebende Lösung mehr oder weniger stark trüben. Es konnten jedoch keine vergleichbar erfahrenen Untersucher herangezogen werden, um diesen untersucherabhängigen Fehler statistisch abzuschätzen.

Eine plausible Festlegung der Begrenzungen der Luftblase kann aus eigener Erfahrung allerdings nur um ein bis drei Pixel differieren (höchstens zwei Pixel in [96]). Ein entsprechender Fehler der Oberflächenspannung durch Fehlbestimmung der Höhe und Breite der Luftblase um jeweils zwei Pixel ist kleiner als 4 % bei Oberflächenspannungen über 5 mNm^{-1} (Abb. 11, S. 54). Ein Unterschied von einem Pixel als kleinste detektierbare Größenänderung entspricht ungefähr 0.02 mm (abhängig von der Abbildungsgröße). Dieser Streckenunterschied kann einen absoluten Meßfehler der Oberflächenspannung von 0.01 mNm^{-1} im günstigsten Fall (niedrige Oberflächenspannung) und von 1 mNm^{-1} im ungünstigsten Fall (hohe Oberflächenspannung, große Blase) verursachen; die Werte der Oberflächenspannung werden daher mit maximal zwei Dezimalstellen angegeben. Eine Luftblase kann damit in diesem Captive-Bubble-Surfactometer ausreichend genau vermessen werden, um die Oberflächenspannung zu berechnen.

Die Überprüfung der Rotationssymmetrie der Luftblasen bezüglich ihrer senkrechten Drehachse wurde exemplarisch in einigen Versuchen durchgeführt. Diese Rahmenbedingung stellt die Berechnung von Oberflächenspannung, Oberfläche und Volumen mit den hier angewendeten Verfahren sicher. Bei bestehender Rotationssymmetrie ist die Tiefe der Blase gleich dem Durchmesser; im günstigsten Fall (hohe Oberflächenspannung) entsprach die Tiefe dem Durchmesser der Luftblase, während dieses Verhältnis im ungünstigsten Fall (niedrige Oberflächenspannung, kleines Volumen, dynamische Zyklen) davon abwich (0.80). Der ungünstigste Fall verursacht allerdings einen Fehler der Oberflächenspannung von maximal 0.75 mNm^{-1} und beeinträchtigt daher nicht wesentlich die Messung dieser entsprechend instabilen Luftblase, die mit anderen Methoden oder unter dynamischen Bedingungen nicht untersucht werden könnte.

Die Überprüfung der Reproduzierbarkeit von Meßwerten im Captive-Bubble-Surfactometer beruht auf dem Vergleich der unter verschiedenen Bedingungen gemessenen Werte. Eine qualitative Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurde hier

als zusammenfassende Beurteilung der verschiedenen Rahmenbedingungen der Experimente vorgestellt. Derartige Abschätzungen wurden für die bereits existierenden Captive-Bubble-Surfactometer bisher nicht publiziert. Im Rahmen der dargestellten Schwankungsbreite dieser Rahmenbedingungen kann daher die Reproduzierbarkeit als ausreichend angenommen und damit zusammenfassend die These I bestätigt werden: Im Captive-Bubble-Surfactometer kann eine flottierende Luftblase in einer Probe erzeugt, temperiert, komprimiert, expandiert, abgebildet und vermessen werden.

9.2 Messung löslichen Surfactants

Die Untersuchung löslichen Surfactants wurde zur Bestätigung der These II, daß die Oberflächenspannung von Wasser 69 mNm^{-1} ist, und These III, daß die Oberflächenspannung wasserlöslichen Surfactants nicht-linear von der Konzentration, aber nicht von der Oberfläche abhängt, durchgeführt. Diese Thesen ließen sich dadurch betätigen, daß Bestätigungsmessungen der Oberflächenspannungen von Wasser und Ethanol in Wasser mit verschiedenen Versuchsprotokollen durchgeführt wurden. Die Ergebnisse des eigenen Captive-Bubble-Surfactometers konnten anhand dieser Bestätigungsmessungen validiert werden.

Die Messungen beruhen dabei darauf, daß in der Grenzfläche einer abgeflachten, halbkugelförmigen Luftblase eine bestimmte Oberflächenspannung auftritt. Im ruhenden System ist diese entlang der gesamten Grenzfläche gleich. Viskositätsabhängige Effekte in der Grenzfläche oder unkontrollierte Energieeinträge in Teile des Meßinstrumentes würden eine unregelmäßige Verteilung von ungleichen Oberflächenspannungen verursachen. Ungleiche Oberflächenspannungen wiederum rufen eine irreguläre Blasen-Geometrie im seitlichen Schnittbild hervor. Die hier untersuchten Luftblasen waren immer achsen- und rotationssymmetrisch und ihre seitlichen Schnittbilder konnten als regelmäßige Schnittbilder zweier Kreis-segmente beschrieben werden.

Geometrische Veränderungen dieser Blasen können daher nur durch Veränderungen der Oberflächenspannung entlang der gesamten Grenzfläche erklärt werden. Viskositätsabhängige oder kinetische Effekte wurden nicht beobachtet; andere rheologische Effekte, die prinzipiell in zähen Grenzschichten aus Phospholipiden auftreten können, haben keinen bekannten Einfluß auf die biophysikalische Oberflächenaktivität [102]. Das Captive-Bubble-Surfactometer mißt daher tatsächlich die Oberflächenspannung einer Oberfläche in einem thermodynamischen Gleichgewichtszustand.

In zahlreichen Experimenten wurde die Oberflächenspannung von Wasser gegen Luft gemessen, die theoretisch unabhängig von der räumlichen Struktur und Größe der Grenzfläche der Blase ist. An der Grenzfläche einer reinen Substanz, in diesem Fall Wasser, ist die Oberflächenspannung eine konstante Größe, die nur vom thermodynamischen Energiegehalt des Systems abhängt. Unter Verwendung quasi-statischer Größenänderungen wurde aber in einigen anfänglichen Versuchen eine Veränderung der Oberflächenspannung hervorgerufen. Es mußte daher angenommen werden, daß sich in der Oberfläche der Luftblase außer Wassermolekülen noch andere Substanzen anreicherten, die im Gegensatz zu Wasser eine Oberflächenaktivität aufwiesen und dadurch zur Senkung der Oberflächenspannung (bis 40 mNm^{-1}) führten.

Diese Schwierigkeit und die Anfälligkeit des Instrumentes gegenüber geringen Mengen oberflächenaktiver Substanzen wurden auch von anderen in ähnlicher Weise beschrieben [84, 85] und stellen auch weiterhin hohe Anforderungen an die verwendeten Materialien. Die präzise Messung der relativ hohen Oberflächenspannung von Wasser ist allerdings auch mit sämtlichen anderen Verfahren schwierig, wobei zum Nachweis einer reinen Grenzfläche und Meßapparatur gering abweichende, aber konstante Oberflächenspannungen unter Oberflächenkompression akzeptiert werden [66].

In allen folgenden Versuchen wurde dem Effekt dieser unerwünschten Kontamination durch besonders intensive Reinigung begegnet, wobei die kontaminierenden Substanzen nicht näher bekannt sind. Diese Reinigung ermöglichte schließlich die Bestimmung der Oberflächenspannung von Wasser gegen Luft (69.7 mNm^{-1}), die mit dem bekannten Wert (69.6 mNm^{-1}) übereinstimmt (Tab. 8, S. 57) und damit These II bestätigt. Durch den Nachweis einer konstanten und hohen ($> 65 \text{ mNm}^{-1}$) Oberflächenspannung für Wasser wurde und konnte vor Durchführung weiterer Experimente eine nicht kontaminierte Meßapparatur sichergestellt werden. Dies wurde zu einem üblichen Vorgehen [85].

Die Meßwerte des Captive-Bubble-Surfactometers für löslichen Surfactant (Wasser und Ethanol in Wasser) wurden dabei zusätzlich statistisch ausgewertet und aus zahlreichen Versuchen zusammengefaßt. Im Gegensatz zur Wilhelmy-Plattenmethode, bei der Meßwerte häufig nur aus Einzelexperimenten vorliegen, erschien es aufgrund der Praktikabilität des Captive-Bubble-Surfactometers möglich und sinnvoll, dessen Meßwerte statistisch zu bewerten und deren Konfidenzbereich anhand bekannter Zusammenhänge zu verkleinern.

In diesem Fall konnten die Streuung der Oberflächenspannungs-Meßwerte von Wasser (4.2 mNm^{-1}) reduziert und der Mittelwert (68.4 mNm^{-1}) korrigiert werden

(95 %-Konfidenzbereich 69.2 bis 72.2 mNm⁻¹) durch die Anwendung der Szyszkowski-Funktion auf diese und die im folgenden diskutierten Ergebnisse für löslichen Surfactant.

Die Anwendung des Captive-Bubble-Surfactometers auf die Messung von Oberflächenspannungen in mittleren Wertebereichen (20–40 mNm⁻¹) erfolgte unter Verwendung verschiedener Konzentrationen des löslichen Surfactants Ethanol in Wasser. Quasi-statische Kompressionen wurden entsprechend den anschließend untersuchten unlöslichen Surfactants eingesetzt und sollten entsprechend den Vorversuchen mit Wasser konstante Oberflächenspannungen zeigen.

Die gefundenen Oberflächenspannungen für diese unterschiedlich konzentrierten Proben stimmten gut mit publizierten Referenzwerten überein (Tab. 8, S. 57). Die eigenen Meßwerte konnten mit starker Korrelation ($R^2=0.987$) anhand eines bekannten Zusammenhangs dargestellt werden (Abb. 14, S. 58). Dies bedeutet, daß die in einzelnen Experimenten nicht unerhebliche Streuung der Meßwerte zu 98.7 % durch das Modell erklärt wird, daß die Oberflächenspannung eine nicht-lineare Funktion der Konzentration eines löslichen Surfactants ist.

Die zum Vergleich herangezogenen publizierten Referenzwerte folgen im Gegensatz zu dieser mathematischen Funktion nicht einer stetig differenzierbaren Ausgleichsline. Da es für ein solches stufenartiges Verhalten löslicher Surfactants aber keine theoretische Erklärung gibt, sollten die diskreten Referenzwerte ebenfalls mit Konfidenzbereichen angegeben werden.

Die Oberflächenspannung eines löslichen Surfactants ist prinzipiell unabhängig von Größenänderungen der Oberfläche; daher sollte keine signifikante Regression ($r \rightarrow 0$) der Oberflächenspannung auf die Größe der Oberfläche bestehen. Die Experimente wurden daraufhin mit Hilfe einer linearen Regression überprüft, wobei der Regressionskoeffizient r auf Abweichung von null getestet wurde. Signifikante Regressionskoeffizienten waren sehr niedrig ($-0.02 \leq r \leq 0.07 \text{ mNm}^{-1}\%^{-1}$) und streuten um null; zusätzlich war der Einfluß der Oberfläche auf die Oberflächenspannung bei Betrachtung der Wertepaare augenscheinlich nicht plausibel. Eine systematische Senkung der Oberflächenspannung durch Kompression der Oberfläche ($r > 0$) besteht demnach bei dem löslichen Surfactant nicht, im Gegensatz zu den anfänglichen Beeinträchtigungen in Experimenten mit reinem Wasser (siehe oben). Dieses Prüfungsverfahren war übermäßig empfindlich und wurde im folgenden nur zum Vergleich mit unlöslichen Surfactants eingesetzt.

Über einen weiten Kompressionsbereich ist daher die Oberflächenspannung des verwendeten löslichen Surfactants als konstant und unabhängig von der Größe der Oberfläche anzusehen. Nach den erfolgreichen Versuchen mit löslichem Sur-

factant, der Bestätigung der Thesen II und III und damit der Validierung des Captive-Bubble-Surfactometers sollte die veränderliche biophysikalische Oberflächenaktivität von unlöslichen Surfactants analysiert werden.

9.3 Messung unlöslicher Surfactants

Die Untersuchungen unlöslicher Surfactants wurden durchgeführt, um die Thesen IV bis VII zu belegen. Als unlösliche Surfactants wurden dabei DPPC, ein künstlicher Surfactant (KS, Exosurf), ein boviner Lipid-Extraktions-Surfactant (BLES, Alveofact) und ein natürlicher Surfactant (Kap. 9.4) untersucht. Phospholipide wie DPPC, der Hauptbestandteil des pulmonalen Surfactants, und andere Tenside senken die Oberflächenspannung, weil ihre hydrophilen und hydrophoben Molekülanteile mit der umgebenden (hier wäßrigen) Phase in starke Wechselwirkung treten: Die Moleküle werden zunächst aufgrund ihrer hydrophoben Gruppen (Fettsäurereste) an die Oberfläche gedrängt, bleiben aber gleichzeitig durch hydrophile Wechselwirkung (Wasserstoffbrückenkräfte, van der Waal-Kräfte) ihrer Kopfgruppe immer in Lösung [18]. Die Oberflächenaktivität solcher unlöslichen Surfactants sinkt mit der Hydrophilie der Kopfgruppe und steigt mit der Hydrophobie der Fettsäurereste.

Diese Anordnung in der Grenzfläche wird als Spreitung bezeichnet und besteht in der lateralen Diffusion der Moleküle von einem Auftrageort, die schließlich zu einem Verteilungsgleichgewicht auf der Oberfläche führt [1]. Messungen an einer solchen Oberfläche beruhen darauf, daß diese eine zweidimensionale Ausdehnung hat; der Oberflächendruck und die Oberflächenspannung sind abhängig von der Größe der Oberfläche, die der Verteilung der Menge an Molekülen zur Verfügung steht. Oberhalb einer kritischen Molekülkonzentration steigt der Oberflächendruck jedoch nicht weiter, weil in wäßriger Lösung Micellen (geschlossene Lipid-Doppelschichten) auftreten, deren Moleküle für einen Einbau in die Oberfläche wahrscheinlich nicht weiter verfügbar sind [18], wenn nicht Substanzen wie SP-B und SP-C diesen Einbau fördern [86, 108].

Diese Eigenschaften unlöslicher Surfactants erforderten die Überprüfung entsprechend der These IV, ob das Captive-Bubble-Surfactometer zur Messung der Oberflächenspannungen dieser Surfactants benutzt werden kann. Dazu wurden in den Experimenten folgende Surfactants eingesetzt: kommerziell erhältliches DPPC; ein künstlicher Surfactant aus DPPC, der mit künstlichen Spreitungs- und Lösemitteln versetzt ist (KS); ein Lipid-Extraktions-Surfactant aus Lavagen von Rinderlungen (BLES), der verschiedene Phospholipide sowie SP-B und SP-C

enthält; und natürlicher Surfactant, der aus Lavagen von Rattenlungen nach Silica-induzierter Schädigung gewonnen wurde.

Diese Surfactants entsprechen strukturellen oder funktionellen Teilen des pulmonalen Surfactant-Systems und wurden modellhaft für die veränderbare biophysikalische Oberflächenaktivität in Alveolen der Lunge untersucht, wobei Adsorptionsmessungen, quasi-statische und dynamische Zyklen durchgeführt wurden. In fast allen Experimenten wurden diese unlöslichen Surfactants in einem wässrigen Standardpuffer resuspendiert. Dieser Teil der Probenvorbereitung wurde unter gleichbleibenden Bedingungen durchgeführt und erfaßte die Erwärmung der Surfactants und eine starke mechanische Vermischung. Durch unterschiedliche Methoden zur Vermischung der Suspensionen (Vortexen, Sonifikation, Rühren) können sich dabei verschiedene Ultrastrukturen (Kap. 4.1.3) der Phospholipide bilden, die in anderen Experimenten (quasi-statische Zyklen) einen Einfluß auf die zu beobachtende Oberflächenaktivität hatten [86, 87].

Die mit der Resuspendierung einhergehende, konzentrationsabhängige Trübung der Subphase begrenzte in den eigenen Experimenten die Vermessung der flottierenden Luftblase: bis zu einer Phospholipidkonzentration von 1.75 mgml^{-1} war mit dem Abbildungssystem die Vermessung möglich. Insgesamt konnte eine unterschiedliche Oberflächenaktivität der unlöslichen Surfactants bereits ab einer Phospholipidkonzentration von 0.2 mgml^{-1} dargestellt werden (Adsorptionsmessungen). Dieser Konzentrationsbereich ist geringfügig kleiner als für das Captive-Bubble-Surfactometer berichtet wurde ($0.05\text{--}3 \text{ mgml}^{-1}$ [101]). Die konzentrations- und ultrastrukturabhängige Trübung der Suspensionen (Turbidität) wurde bisher von keiner Arbeitsgruppe dazu genutzt, um die biophysikalische Verfügbarkeit der oberflächenaktiven Phospholipide anhand der einfach zu messenden Lichtextinktion der Suspensionen abzuschätzen [88].

Der Einsatz des Captive-Bubble-Surfactometers zur Messung unlöslicher Surfactants war daher prinzipiell möglich und die These IV wird durch diese vorläufige Zusammenfassung der Ergebnisse unlöslicher Surfactants (natürlicher Surfactant: Kap. 9.5) bestätigt. Im weiteren werden zunächst die Ergebnisse der einzelnen Versuchsprotokolle (Adsorptionsmessungen, quasi-statische und dynamische Zyklen) bei DPPC, künstlichem und bovinem Lipid-Extraktions-Surfactant und daran anschließend bei natürlichem Surfactant diskutiert.

9.3.1 Adsorptionsmessungen

Als Adsorption (Kap. 3.4) wird eine kontinuierliche Veränderung und schließlich ein Konzentrations-Gleichgewicht bezeichnet, das sich in der Grenzfläche zwi-

schen zwei Phasen einstellt. Dieser Vorgang ist ein wesentlicher Teil der biophysikalischen Wirkungsweise des pulmonalen Surfactants (Kap. 4.3). In ultrastrukturell untersuchten Alveolen wurde eine vollständige Auffüllung und vollständige Bedeckung der Oberfläche mit pulmonalem Surfactant nachgewiesen [14], jedoch gibt es auch Modelle der biophysikalischen Wirkungsweise, die eine Unvollständigkeit des Oberflächenfilms annehmen (Kap. 4.2).

Pulmonaler Surfactant umfaßt solche amphiphilen Phospholipide, die praktisch wasserunlöslich sind und in wäßriger Umgebung aufgrund ihrer vergleichsweise niedrigen kritischen Micellenkonzentration ($0.2 \text{ mmol}^{-1} \approx 1.5 \text{ mgml}^{-1}$ [18]) wahrscheinlich als Micellen vorliegen [46]. Wenn es zur Adsorption von Phospholipiden durch Vergrößerung der Oberfläche kommt, können mit diesen relativ großen Micellen entsprechend viele Lipid-Moleküle in die Grenzfläche transportiert werden [39]. Die bekannte Gleichgewichts-Oberflächenspannung von Oberflächenfilmen aus DPPC, dem Hauptbestandteil der Phospholipide im pulmonalen Surfactant, beträgt ungefähr 23 mNm^{-1} [1].

Das Adsorptions-Gleichgewicht der vollständigen Bedeckung und Auffüllung wird nach einer einmaligen Veränderung der Oberfläche je nach verwendeter Untersuchungsmethode in einem Zeitraum von Minuten bis Stunden wieder erreicht. Dieser Zeitraum ist besonders kurz bei pulmonalem Surfactant, der im allgemeinen eine sehr schnelle Adsorptionskinetik (Sekunden) aufweist [126], die zumindest der Atemfrequenz entsprechen muß [39]. Diese Kinetik wurde auch in den eigenen Experimenten zur Beurteilung der Wirkungsweise der eingesetzten Surfactants und zur Bestätigung ihres Adsorptions-Gleichgewichts der Oberflächenspannung bestimmt (These V). Dazu wurden die unlöslichen Surfactants durch Oberflächen-Vergrößerung zur Adsorption aus der Subphase gebracht und zum Spreiten auf der Oberfläche veranlaßt.

Die Adsorptionsmessungen der unlöslichen Surfactants mit dem hier vorgestellten Captive-Bubble-Surfactometer zeigten ohne Ausnahme eine Senkung der Oberflächenspannung während und nach der Vergrößerung der Oberfläche, die vorübergehend die Erhöhung der Oberflächenspannung verursacht. Gegenüber der hier begrenzten Aussagemöglichkeiten für einzelne Surfactants zeigt die vergleichende Darstellung der Adsorptionskinetik bei gleicher Phospholipidkonzentration deutliche Unterschiede der Oberflächenaktivität (Abb. 31, S. 90).

Unter Verwendung einer Phospholipidkonzentration von 0.2 mgml^{-1} hatte BLES die kürzeste Halbwertszeit und niedrigste Gleichgewichts-Oberflächenspannung; KS adsorbierte vergleichbar schnell wie BLES, hatte aber eine ähnlich hohe Gleichgewichts-Oberflächenspannung wie DPPC. DPPC adsorbierte deutlich

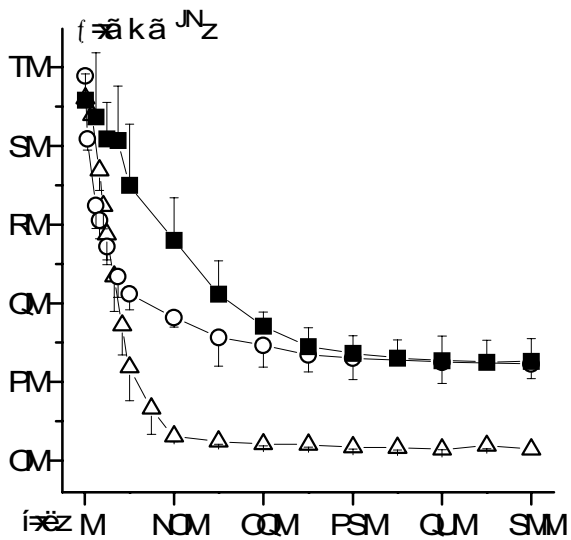


Abb. 31: Adsorptionsverhalten von DPPPC, KS und BLES

Mittel und Standardabweichung der Oberflächenspannung (γ) aus je drei Experimenten mit DPPPC (■), KS (○) und BLES (△) in Abhängigkeit von der Adsorptionsdauer (t) bei einer Phospholipidkonzentration von 0.2 mgml^{-1} .

BLES erreichte die niedrigste Gleichgewichts-Oberflächenspannung (γ_{\min}) verglichen mit den anderen Surfactants. KS zeigte eine mit BLES, aber nicht mit DPPPC vergleichbare hohe Geschwindigkeit ($t_{1/2}$) der Senkung der Oberflächenspannung. KS und DPPPC erreichten im Beobachtungszeitraum jedoch nicht die erwartete Gleichgewichts-Oberflächenspannung für Phospholipid-Oberflächenfilme ($\approx 23 \text{ mNm}^{-1}$).

langsamer als die anderen Surfactants. In den Adsorptionsmessungen schien seine Verfügbarkeit zum Einbau in die Grenzfläche von der aktuellen Phase und Konsistenz der Probe abhängig zu sein, wie auch von anderen beobachtet, aber noch nicht systematisch untersucht wurde [86, 88].

Die Versuchstemperatur bestimmt dabei den Phasenzustand, der hier besonders hinsichtlich des bekannten Gel-Flüssigkeits-Übergangs von DPPPC bei 39°C zu berücksichtigen ist. Die Möglichkeit einer Adsorption von DPPPC wird von einigen bestritten, weil DPPPC bei der hier eingesetzten Versuchstemperatur (37°C) als feste Phase (Gel) vorliegt [10]. Andere beschreiben allerdings die Adsorption der flüssigen Phase an die feste Phase von DPPPC, die ebenso zur Anreicherung und Ausbreitung von DPPPC in der Grenzfläche führen kann [18]. DPPPC erfüllt ent-

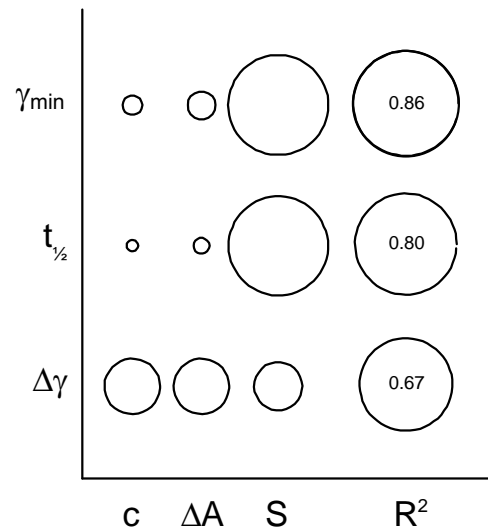


Abb. 32: Einflußgrößen auf das Adsorptionsverhalten

Einfluß der Phospholipidkonzentration (c), der Oberflächenvergrößerung (ΔA) und der Art des Surfactants (S ; DPPPC, KS, BLES) auf die Zielgrößen niedrigste Oberflächenspannung (γ_{\min}), Halbwertzeit ($t_{1/2}$) und Spanne zwischen beobachteter höchster und niedrigster Oberflächenspannung ($\Delta\gamma$). Die Flächen der Einflußgrößen entsprechen ihrem Anteil am insgesamt bestehenden Einfluß (R^2), der durch ein verallgemeinertes lineares Modell aller Einflußgrößen auf jeweils eine Zielgröße erklärt wird.

Die unterschiedliche Art des Surfactants zeigte einen großen Einfluß auf die niedrigste Oberflächenspannung und Halbwertzeit, die durch die Konzentration oder Oberflächenvergrößerung nur wenig beeinflusst wurden.

sprechend auch bei Tieren mit niedriger Körpertemperatur (unter 37 °C) wesentliche biophysikalische Funktionen (mit Ausnahme der Änderung der Compliance) und hat den größten Phospholipid-Anteil an deren pulmonalem Surfactant [28]. Eine Erhöhung der Versuchstemperatur im Captive-Bubble-Surfactometer (über 39 °C) könnte allerdings bewirken, daß die relativ großen Mengen an DPPC in den untersuchten Surfactants dann unabhängig von den anderen Substanzen in den Surfactants (SP-B, SP-C; Alkohole, Tyloxapol) adsorbieren und die beobachteten Unterschiede der Adsorptionskinetik geringer werden. Solche Temperaturen beeinträchtigen zusätzlich die Stabilität der Surfactant-Proteine.

Eine zusammenfassende Beurteilung (Abb. 32, S. 90) zeigt insbesondere, daß die Wahl des Surfactants gegenüber der Oberflächenvergrößerung und der Konzentrationsänderung den größten Einfluß auf die Adsorption hatte. Die eingesetzten Surfactants unterscheiden sich demnach deutlich hinsichtlich der bedeutenden Parameter Adsorption, niedrigste Oberflächenspannung und Halbwertzeit. Das hierzu verwendete verallgemeinerte lineare Modell kann die beobachtete Spanne während der Adsorption nur schlechter erklären und die wesentlichen Einflußgrößen auf diese Zielgröße weniger unterscheiden.

Die Veränderung der Phospholipidkonzentration des jeweiligen Surfactants zeigte in den Adsorptionsversuchen nur eine geringe Auswirkung auf die Halbwertzeit (jeweils $R^2 < 0.2$, Abb. 32, S. 90). Dieses kann mit der gesteuerten, aber unterschiedlichen Oberflächenvergrößerung in Zusammenhang stehen: In Versuchen mit KS konnte eine höhere Phospholipidkonzentration eine geringe Oberflächenvergrößerung hinsichtlich der Halbwertzeit ausgleichen (Tab. 10, S. 65). In Versuchen mit BLES hingegen wurde bei hoher Konzentration eine verlängerte Halbwertzeit beobachtet, die aber bei geringer Zahl der Experimente und zusätzlich aufgetretenen Luftblasen als fehlerhaft angenommen wird.

Zur Bestätigung der von anderen gefundenen, umgekehrten proportionalen Beziehung zwischen der Phospholipidkonzentration und der Halbwertzeit sollten zunächst noch weitere Meßpunkte unterhalb der kritischen Micellenkonzentration bestimmt werden [100]. Die gemäß These V nachzuweisende Senkung der Oberflächenspannung durch eine schnelle Adsorptionskinetik wird daher bestätigt, während der Einfluß der Konzentration nicht ausreichend zu belegen ist.

Diese Adsorptionsversuche vermitteln als Endpunktmessungen erste Informationen in Hinsicht auf die biophysikalische Oberflächenaktivität. In den folgenden zyklischen Versuchen wurde die Kinetik der Änderung dieser Oberflächenaktivität untersucht. Für den Vergleich der verschiedenen Surfactants wird zunächst die

Modellvorstellung erläutert, die der bekannten Charakteristik der Kompressions-Expansions-Isothermen von DPPC-Oberflächenfilmen zugrunde liegt.

9.3.2 Quasi-statische Zyklen

Quasi-statische Zyklen im Captive-Bubble-Surfactometer sind dadurch charakterisiert, daß die Zufuhr kinetischer Energie in die Probe durch möglichst langsame und kleine (quasi-statische) Veränderungen der Luftblasen-Oberfläche vermieden wird. Solche Versuche werden durchgeführt, um veränderliche (diskontinuierliche) Eigenschaften von oberflächenaktiven Substanzen zu untersuchen; diese allgemeinen Eigenschaften werden im folgenden zusammen mit den Ergebnissen für die unlöslichen Surfactants (DPPC, KS, BLES und RLL) diskutiert.

Entsprechend der These VI sind für die unlöslichen Surfactants unter quasi-statischen Versuchsbedingungen eine oberflächenabhängige Oberflächenspannung, eine minimale Oberflächenspannung ($\gamma < 5 \text{ mNm}^{-1}$ [101]) und eine niedrige Kompressibilität ($k_{15} < 0.02 \text{ mmN}^{-1}$ [84]) zu zeigen. Diese abgeleiteten Werte sollten es ermöglichen, die unlöslichen Surfactants über die Endpunktmessungen der Adsorptionsversuche hinaus zu unterscheiden und charakterisieren.

Die allgemeinen Eigenschaften einer unlöslichen oberflächenaktiven Substanz werden hier anhand einer quasi-statischen Kompressions-Isotherme von DPPC, dem Hauptbestandteil des pulmonalen Surfactants, beispielhaft in Abb. 33 gezeigt. Eine solche Isotherme tritt bei einer monomolekularen und vollständig bedeckten Oberfläche auf, die durch quasi-statische Verkleinerung der Oberfläche (in der Abbildung: von rechts nach links) vollständig aufgefüllt wird. Dadurch

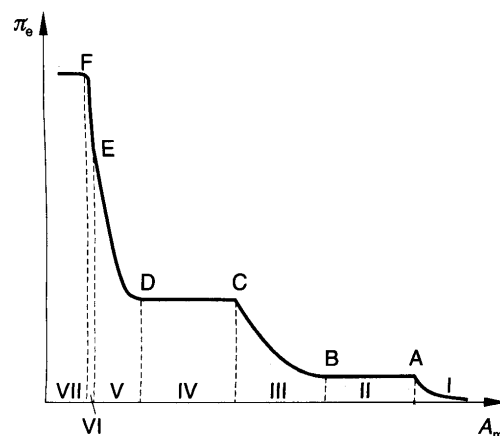


Abb. 33: Kompressions-Isotherme

Dargestellt wird der Oberflächendruck (π_e) innerhalb einer DPPC-Monoschicht in Abhängigkeit von der Größe der Oberfläche (A_m). Messung mit der Wilhelmy-Plattenmethode. Die Bereiche verschiedener Konformationen (I-VII) und Übergangspunkte (A-F) werden im Text erläutert. Aus [18].

wird bei unlöslichen Surfactants die Oberflächenspannung minimal (in der Abbildung: maximaler Oberflächendruck), im Gegensatz zur gleichbleibenden Oberflächenspannung bei löslichen Surfactants. Die hier getesteten unlöslichen Surfactants zeigten in der Tat eine Veränderung der Oberflächenspannung in Abhängigkeit von der Oberfläche. Im ersten quasi-statischen Zyklus zeigte DPPC durch eine Oberflächenverkleinerung von 70 % eine Veränderung der Oberflächenspannung um 40 mNm^{-1} (dies entspricht $0.57 \text{ mNm}^{-1}\%$; Grenzflächeninjektion, Abb. 17, S. 60). Die Werte für DPPC ($0.48 \text{ mNm}^{-1}\%$; Suspension, Abb. 18, S. 61), KS (0.73 ; Abb. 22, S. 66) und BLES (0.38 ; Abb. 25, S. 70) sind ebenfalls um ein Vielfaches höher als bei löslichem Surfactant (maximal $0.019 \text{ mNm}^{-1}\%$).

Diese unlöslichen Surfactants zeigten damit sicher eine Veränderung der Oberflächenspannung in Abhängigkeit von der Oberfläche, obwohl die hier gefundenen Werte geringer sind als die von anderen im Captive-Bubble-Surfactometer gemessenen Werte ($\approx 1.4 \text{ mNm}^{-1}\%$; abgeschätzt aus einem Diagramm in [99]).

In den Versuchen mit Grenzflächen-Injektion von DPPC fanden sich Kompressions-Expansions-Isothermen (Abb. 17, S. 60), die qualitativ gut übereinstimmen mit denen anderer Meßmethoden [26, 85, 101] und mit der zum Vergleich abgebildeten Isotherme (Abb. 33, S. 92). Die DPPC-Konzentration in der Oberfläche (molekulare Packungsdichte) entsprach allerdings dem Dreifachen der Konzentration in anderen Versuchen [101]. Eine Erklärung dafür könnten unbekannte Anteile der DPPC-Grenzschicht sein, die bei der gewählten Temperatur ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) unterhalb des Gel-Flüssigkeit-Übergangs von DPPC weniger oberflächenaktiv sind [10].

Eine oberflächenabhängige Oberflächenspannung (nach These VI) konnte damit zusammenfassend unter isothermen (quasi-statischen) Zyklen mit unlöslichen Surfactants nachgewiesen werden. Durch den oberflächenabhängigen Druck wird die Packungsdichte der Moleküle des Oberflächenfilms verändert und dadurch das Auftreten einer minimalen Oberflächenspannung bestimmt: DPPC-Moleküle diffundieren ungehindert lateral (Bereich I in Abb. 33, S. 92), während sie bei höchstem Oberflächendruck fest-kondensiert sind (VI und VII). Dieser Druck entspricht dem Gleichgewicht-Kollapsdruck und damit der minimalen Oberflächenspannung des nicht-kollabierten Oberflächenfilms [1, 18].

Alle hier untersuchten Surfactants zeigten eine solche minimale Oberflächenspannung bei maximaler Oberflächenverkleinerung. Die Werte dieser Oberflächenspannung (unter 5 mNm^{-1}) lagen dabei in allen Fällen deutlich unterhalb der erwarteten Gleichgewichts-Oberflächenspannung für Phospholipid-Filme ($\approx 23 \text{ mNm}^{-1}$). Solche Werte wurden für DPPC und Exosurf (KS) bereits mit

verschiedenen Methoden gefunden [98, 101, 126], während Werte für Alveofact (BLES) bisher nur mit dem Pulsierende-Blase-Surfactometer bestimmt wurden [106], mit dem im Gegensatz zum eigenen Captive-Bubble-Surfactometer keine quasi-statischen Zyklen untersucht werden können.

Niedrige Oberflächenspannungen ($<25 \text{ mNm}^{-1}$) unter Benutzung von pulmonalem Surfactant können aufgrund eigener und publizierter Ergebnisse angenommen werden [85, 94, 127]. Es wird allerdings diskutiert, wie Oberflächenfilme durch (quasi-) statische Veränderungen überhaupt solche Nicht-Gleichgewichtszustände erreichen können. Derartige metastabile Oberflächenfilme werden von einigen Autoren für nicht systematisch untersuchbar gehalten [10, 53], während andere die Filme als stetig verändert und kontinuierlich interpretierbar ansehen [1, 21]. In Bestätigungsversuchen konnten allerdings Oberflächenspannungen unter 5 mNm^{-1} für pulmonalen Surfactant auch in vivo und unter statischen Bedingungen nachgewiesen werden [8, 90].

Metastabile Oberflächenfilme können unter ausreichender Oberflächenkompression dadurch entstehen, daß Teile des Oberflächenfilmes kollabieren und in die Ober- oder Unterphase gedrängt werden. Filmanteile können wieder in die Oberfläche eingebaut werden [11] oder zu Multischichten unterhalb der Oberfläche werden. Solche Multischichten sind in alveolärem Surfactant auch in elektronenmikroskopischen Untersuchungen zu finden [36].

Da diese Multischichten insbesondere bei Überkompression der Oberfläche (Bereich VII in Abb. 33, S. 92) oder bei hoher Phospholipidkonzentration (120 mgml^{-1} in alveolärem Surfactant [83]) auftreten, sind sie für das pulmonale Surfactant-System wahrscheinlich bedeutsam, jedoch weder ausreichend untersucht noch theoretisch diskutiert [14, 81, 99]. Wahrscheinlich ist es die biophysikalische Funktion der obersten Schicht, die Oberflächenspannung zu senken, und die Funktion der darunter liegenden Schichten, ein mit der Oberfläche assoziiertes Surfactant-Reservoir darzustellen [99].

In den eigenen Versuchen mit unlöslichen Surfactants unter quasi-statischen Zyklen wurde eine Überkompression der Oberfläche vermieden; ein Überkompressions-Plateau (Bereich VII) ohne Veränderung der Oberflächenspannung konnte nicht nachgewiesen werden. Die gemessenen Werte minimaler ($< 5 \text{ mNm}^{-1}$) Oberflächenspannungen gelten daher tatsächlich für Monoschichten und bestätigen die Teilaussage der These VI, daß bei unlöslichen Surfactants die minimale Oberflächenspannung gegen null streben kann.

Bei minimaler Oberflächenspannung und unter maximaler Kompression traten in den Versuchen keine weiteren Änderungen der Oberflächen-Eigenschaften auf.

Während der zunehmenden Oberflächen-Kompression konnten allerdings in aufeinanderfolgenden Abschnitten eines Zyklus und mehrerer Zyklen verschiedene Eigenschaften unterschieden werden. Die Kompressibilität und mechanische Stabilität werden im folgenden als Eigenschaften eines Abschnittes eines einzigen Zyklus diskutiert; anschließend werden diese und weitere Eigenschaften (minimale Oberflächenspannung und Hysterese) zwischen aufeinanderfolgenden Zyklen miteinander verglichen.

Die Kompressibilität ist eine Maßzahl für den Widerstand einer Oberfläche gegen Verformung und damit auch Ausdruck der Stabilität der Oberfläche. Die Kompressibilität wurde bei einer bestimmten Oberflächenspannung (15 mNm^{-1}) für DPPC (0.06 mmN^{-1} ; Grenzflächen-Injektion), DPPC (0.01 ; Suspension), KS (0.01 ; zehnter Zyklus), BLES (0.02 ; zwanzigster Zyklus) und natürlichen Surfactant (0.01 mmN^{-1} ; zehnter Zyklus) berechnet. Die Größenordnung dieser Werte entspricht derjenigen einer DPPC-Monoschicht (0.008 mmN^{-1} [105, 126]) und den bei natürlichem Surfactant gefundenen Werten (0.01 mmN^{-1} [83]), mit Ausnahme der relativ hohen Kompressibilität der Versuche mit Grenzflächen-Injektion. Letztere Werte könnten im Zusammenhang mit der hohen eingesetzten Konzentration an DPPC in der Oberfläche allerdings auf die Ausbildung von Multischichten hinweisen, deren Verformungs-Widerstand als gering und Kompressibilität als hoch eingeschätzt wird. Es sind jedoch keine Grenzwerte zur Unterscheidung von Mono- und Multischichten bekannt.

Die Kompressibilität wird im allgemeinen aus wenigen Wertepaaren während einer Kompressions-Isotherme abgeleitet und ist untersucherabhängigen Fehlern (Festlegung der diskreten Meßpunkte) und rechentechnischen Fehlern (Wahl der Approximation) unterworfen. Die Favorisierung dieses Wertes als definitiver Maßstab der Oberflächenaktivität [85] ist daher noch nicht ausreichend begründet. In den eigenen Versuchen konnte eine niedrige Kompressibilität allerdings für alle steilen Abschnitte der Kompressions-Isothermen (Bereich V und Abb. 17, S. 60) mit Hilfe von Spline-Funktionen zuverlässig berechnet werden.

Die mechanische Stabilisierung der Alveolen gegenüber wechselnden Volumina und Drücken ist eine wesentliche Funktion des pulmonalen Surfactants und wurde mit dem eigenen Captive-Bubble-Surfactometer nur exemplarisch untersucht, da größere Unterschiede bei anderen Meßwerten der biophysikalischen Surfactant-Aktivität vermutet wurden. Die Messungen der Stabilität wurden dazu in Abhängigkeit von der Zeit durchgeführt und die Veränderungen der Oberflächenspannung, der Oberfläche und des Volumens der Luftblasen beobachtet. Der Anstieg der Oberflächenspannung war bei KS deutlich ($13 \text{ mNm}^{-1}\text{min}^{-1}$; erster

Zyklus, anschließend fast null) und bei natürlichem Surfactant niedriger ($0.3 \text{ mNm}^{-1}\text{min}^{-1}$). Für natürlichen Surfactant wurde zusätzlich eine Zunahme der Stabilität auch in Abhängigkeit von der Dauer der Silica-induzierten Lungenschädigung gefunden (Tab. 16, S. 77). Diese Werte für KS und natürlichen Surfactant sind vergleichbar mit publizierten Werten [100]. Bei natürlichem Surfactant bestand eine Oberflächenverkleinerung von 20 % und ein Volumenverlust von $4 \mu\text{l}$ in 30 min. Diese Veränderungen sind allerdings auf die Drucksteuerung des Captive-Bubble-Surfactometers zurückzuführen und können nicht mit Veränderungen in situ verglichen werden.

Der folgende Vergleich dieser Eigenschaften in verschiedenen, aufeinanderfolgenden Zyklen beruht auf der begründeten Annahme, daß sich die Zusammensetzung des Oberflächenfilms im Laufe eines Versuchs ändert. Diese Veränderungen konnten für aufeinanderfolgende quasi-statische Zyklen mit unlöslichen Surfactants auch mit dem eigenen Captive-Bubble-Surfactometer dargestellt werden, wobei prinzipiell eine gesteigerte biophysikalische Aktivität beobachtet wurde: In den meisten Experimenten wurde eine Abnahme der Kompressibilität berechnet, die einer höheren Stabilität der Oberfläche entspricht. Im Vergleich der ersten quasi-statischen Zyklen zeigte einzig DPPC eine steile Isotherme mit niedriger Oberflächenspannung und niedriger Kompressibilität (Abb. 19, S. 63), während KS und BLES zunächst flache Isothermen mit weiter Hysterese zeigten.

Die Isothermen der letzteren Surfactants (KS und BLES) veränderten sich stärker durch wiederholte Kompressions-Expansions-Zyklen und zeigten dann erst minimale (unter 5 mNm^{-1}) und stabile Oberflächenspannungen. Isothermen des natürlichen Surfactants nach Silica-induzierter Lungenschädigung (Abb. 29, S. 76) und von den Kontrolltieren (Abb. 28, S. 76) zeigten unterschiedliche Oberflächenaktivität. Während Kontroll-Surfactant erst nach zahlreichen Zyklen eine niedrige Oberflächenspannung zeigte, war die biophysikalische Oberflächenaktivität nach Lungenschädigung höher und verringerte sowohl die Oberflächenspannung als auch die Hysterese fläche.

Entsprechend der These VI konnten die Oberflächenaktivität der unlöslichen Surfactants DPPC, KS, BLES und RLL im eigenen Captive-Bubble-Surfactometer differenziert und charakterisiert werden. Diese Surfactants zeigten unter quasi-statischen Zyklen eine oberflächenabhängige Oberflächenspannung, eine minimale Oberflächenspannung ($\gamma < 5 \text{ mNm}^{-1}$) und eine niedrige Kompressibilität ($k_{15} < 0.02 \text{ mmN}^{-1}$). Im folgenden wird die Differenzierung unter dynamischen Zyklen dargestellt.

9.3.3 Dynamische Zyklen

Im Gegensatz zu den vorangegangenen Adsorptionsmessungen und quasi-statischen Zyklen werden während schneller periodischer Veränderungen der Oberfläche (innerhalb von mehreren Sekunden) keine Gleichgewichtsbedingungen erreicht, sondern dynamische Vorgänge erfaßt. Durch unterschiedliche Bedingungen können im Captive-Bubble-Surfactometer metastabile Oberflächen untersucht werden, die im allgemeinen für eine gewisse Dauer minimale Oberflächenspannungen zeigen und nach genügend langer Beobachtungsdauer wieder zu (höheren) Gleichgewichts-Oberflächenspannungen zurückkehren. In diesem Zusammenhang ist die Bestätigung der These VII relevant, die besagt, daß unter dynamischen Zyklen die Spannweite der Oberflächenspannung zunimmt und die Hysterese fläche sowie Oberflächenreduktion abnehmen. Diese Veränderungen sind von der Anzahl der durchgeführten Zyklen abhängig und werden zur Bestätigung der These VII dargestellt.

Im Vergleich zwischen dynamischen ($10 \text{ min}^{-1} \approx 35 \text{ \%min}^{-1}$) und quasi-statischen Kompressions-Expansions-Zyklen ($0.03 \text{ min}^{-1} \approx 2 \text{ \%min}^{-1}$) zeigten sich unterschiedliche Veränderungen der Oberflächenspannungen. Dynamische Zyklen hatten bei KS (Abb. 23, S. 67) und BLES (Abb. 25, S. 70) eine höhere Spannweite der Oberflächenspannung und eine größere Hysterese-Fläche gegenüber vergleichbaren quasi-statischen Zyklen (Kap. 9.3.2). Alle verwendeten unlöslichen Surfactants zeigten im Verlauf von mehreren dynamischen Zyklen unterscheidbare Veränderungen der minimalen und maximalen Oberflächenspannung (Abb. 19, S. 63). Diese führten zu einer typischen Spannweite der Oberflächenspannungen bei DPPC (48 mNm^{-1}), KS (35 mNm^{-1}), BLES (21 mNm^{-1}) und bei natürlichem Surfactant (20 mNm^{-1}).

Die minimalen Oberflächenspannungen bei maximaler Oberflächenkompression waren bei allen Surfactants kleiner als 5 mNm^{-1} und damit deutlich kleiner gegenüber den Ausgangswerten und der Gleichgewichts-Oberflächenspannung von Phospholipid-Oberflächenfilmen ($\approx 23 \text{ mNm}^{-1}$ [26]). Diese Daten stimmen mit publizierten Befunden überein, daß diese extrem niedrigen Oberflächenspannungen durch dynamische, viskositätsunabhängige Adsorptionsvorgänge entstehen und zur Stabilisierung von Blasen führen [21]. Die gegenüber den Ausgangswerten höheren Oberflächenspannungen bei maximaler Oberflächenexpansion traten nur bei DPPC und KS auf; bei BLES konnte die dynamische Adsorption während der Oberflächenexpansion einen Anstieg der Oberflächenspannung über den Ausgangswert verhindern.

Die Bestimmung der Hystereseffläche, die von jeweils einer Kompressions-Expansions-Isotherme umschlossen wird, war nicht in allen durchgeführten dynamischen Zyklen möglich und wurde dadurch beeinträchtigt, daß starke Streuungen innerhalb in den Experimenten auftraten. Diese wurden auch nach der Standardisierung der Oberfläche durch Kategorisierung der Meßwerte (Abb. 18, S. 62) beobachtet; trotzdem entsprechen die berechneten Werte der Hystereseffläche der Erwartung, daß diese Werte in aufeinanderfolgenden Zyklen abnehmen (Tab. 9, S. 62). Solche Maßzahlen für die Hystereseffläche sind bisher noch nicht publiziert worden und können unter Berücksichtigung der Skalierung für den Vergleich von experimentellen Ergebnissen genutzt werden.

Die Auswertung ergab weiterhin, daß die Veränderung der Oberfläche durch Kompression während der dynamischen Zyklen nicht konstant blieb: In anfänglichen dynamischen Zyklen wurde dabei eine verhältnismäßig starke Kompression der Oberfläche verursacht, während nach einigen Zyklen der Oberflächenfilm durch Aufrechterhaltung einer stabilen, nicht weiter komprimierbaren Oberfläche das Ausmaß dieser Kompression begrenzte (Abb. 24, S. 69). Diese Art der Auswertung kann die Frage beantworten, wie groß die Oberflächen-Kompression zum Erreichen einer minimalen Oberflächenspannung sein muß; verschiedene Meßinstrumente zeigten hierzu unterschiedliche Ergebnisse (20–80 % [91]).

Die zeitliche Auswertung der dynamischen Zyklen zeigte, daß die Veränderung der Oberflächenspannung sich nicht synchron zur Oberflächen-Kompression ereignete. Der Zeitpunkt, zu dem die minimale Oberflächenspannung unter Kompression erreicht wurde, lag vor dem Abschluß der Kompression selbst (Abb. 23, S. 67). Diese Beobachtung verdeutlicht, daß die Oberfläche nur indirekt durch den Systemdruck gesteuert wird und nicht unmittelbare Regelgröße des Captive-Bubble-Surfactometers ist. Es existieren allerdings andere Methoden (u.a. Pendant-Drop-Surfactometer), die eine unverzögerte Regelung der Oberfläche in Abhängigkeit von der Oberflächenspannung ermöglichen.

Zusammenfassend kann die Analyse von dynamischen Zyklen sich im wesentlichen auf die Spannweite der Oberflächenspannung bei maximaler und minimaler Blase beschränken (Abb. 24, S. 69), solange nicht aus den Meßwerten zuverlässigere Ableitungen möglich sind, die zur weiteren Charakterisierung der Oberflächenfilme beitragen können. Die vorgestellten Ergebnisse zur Kinetik der dynamischen Zyklen im Captive-Bubble-Surfactometer belegen daher die These VII, daß in Abhängigkeit von der biophysikalischen Aktivität die Spannweite der Oberflächenspannung zunimmt und die Hystereseffläche sowie die notwendige Oberflächenreduktion abnehmen.

Nachdem zunächst die biophysikalischen Eigenschaften eines löslichen und mehrerer unlöslicher Surfactants dargestellt wurden, werden im folgenden die Ergebnisse der biochemischen und biophysikalischen Charakterisierung eines natürlichen Surfactants diskutiert. Die biophysikalischen Ergebnisse der untersuchten unlöslichen und des natürlichen Surfactants werden im Kapitel 9.5 abschließend miteinander verglichen und beurteilt.

9.4 Natürlicher Surfactant bei Silica-induzierter Lungenschädigung

Nachdem in den vorangehenden Kapiteln die prinzipielle Funktionsfähigkeit des Captive-Bubble-Surfactometers für die Messung der Oberflächenspannung gezeigt wurde, sollte die Tauglichkeit des Instrumentes zur biophysikalischen Untersuchung natürlichen Surfactants exemplarisch nachgewiesen werden. Dazu wurden verschiedene Eigenschaften natürlicher Surfactants bestimmt, die aufgrund einer zeitabhängigen Lungenschädigung unterschiedlich zusammengesetzt waren. Die Ausgangswerte vor Lungenschädigung werden dabei mit publizierten Eigenschaften verglichen und die zeitabhängigen Meßwerte der veränderten Surfactant-Zusammensetzung gegenübergestellt.

Es ist bekannt, daß unterschiedliche Noxen die Lunge unterschiedlich schädigen können; dabei kann auch das Surfactant-System betroffen sein. Die Schädigung kann im Tiermodell den Krankheitsbildern ARDS, Silikose oder Alveolarproteinose ähneln [30, 57]. Die hier eingesetzte Noxe (Silica) induzierte eine Lungenschädigung, wie sie bei der Alveolarproteinose vorkommt [29]. Die gefundenen Veränderungen bei diesem experimentellen Vorgehen beziehen sich auf das Feuchtgewicht und den makroskopischen Befund der Lungen sowie auf biochemische und biophysikalische Befunde der Lungenlavagen. Die damit verbundene These VIII beinhaltet, daß durch die Schädigung eine Steigerung des Protein- und Lipidgehalts auftritt, während die Phospholipidanteile und die biophysikalische Aktivität des Surfactants weitestgehend von diesen unabhängig sind.

Die Lungenschädigung der in Kap. 8.4 vorgestellten Experimente zeigte sich in den folgenden Veränderungen des entnommenen Organs: höheres Feuchtgewicht, derbe Konsistenz und gräuliche Verfärbung (Tab. 12, S. 72). Diesen Veränderungen liegen wahrscheinlich eine Zellhypertrophie und vermehrte Kollagensynthese zugrunde, wie anderenorts publiziert wurde [51].

Die biochemische Charakterisierung der bronchoalveolären Lavagen aus diesen Lungen zeigte, daß sowohl die Phospholipid- als auch die Protein-Konzentrationen mit der Dauer der Lungenschädigung drastisch zunehmen (jeweils 20- und 30-fach). Die gefundenen Werte sind gut vergleichbar mit anderen Daten [29].

Die Phospholipidkonzentration wurde mit zwei unabhängigen Methoden bestimmt (Phosphor-Assay und HPLC). Es ist davon auszugehen, daß der Phosphor-Assay ungenauer ist, wohingegen die HPLC-Bestimmung nur bestimmte Phospholipidklassen exakt erfaßt. Daher war nicht zu erwarten, daß der Massen-Umrechnungsfaktor in eigenen Versuchen (Phosphor:Phospholipid=1:22.5) mit dem bekannten, durchschnittlichen Faktor (1:25) übereinstimmt.

Der schnellere Anstieg der Protein-Konzentration gegenüber der Phospholipidkonzentration entspricht der bekannten Kinetik der Silica-induzierten Sekretionsstörung von Surfactant [29]. Diese beruht hauptsächlich auf der funktionellen Hypertrophie von alveolären Typ-II-Zellen mit konsekutiver Steigerung der Surfactant-Sekretion bei normalem Surfactant-Abbau [51]. Zusätzlich ist bekannt, daß durch diese Schädigung der Typ-II-Zellen qualitative und quantitative Veränderungen des SP-A und SP-B auftreten [51, 54]; deren Auswirkungen auf die Oberflächenaktivität des Surfactants sind hingegen nicht bekannt.

Die Verteilung der verschiedenen Phospholipidklassen wurde mit einer neueren HPLC-Methode untersucht [20]. Dabei wurden zunächst unkonzentrierte und konzentrierte Proben des Surfactants miteinander verglichen, wobei keine wesentlichen Unterschiede durch die Konzentration mittels Ultrazentrifugation auftraten. Dieses entspricht weitgehend anderen Untersuchungen [60, 72].

Gegenüber dem eher geringen Einfluß der Ultrazentrifugation auf die Verteilung der Phospholipidklassen besteht ein großer Einfluß auf die Verteilung der oberflächenaktiven Ultrastrukturen; mit der hier gewählten Art der Ultrazentrifugation wurde jedenfalls von anderen die höchste Oberflächenaktivität im Sediment gefunden [83]. Neben dem Einfluß der Ultrazentrifugation wurde der Einfluß der Silica-induzierten Lungenschädigung auf die Verteilung der Phospholipidklassen untersucht. Dabei zeigte sich im Verlaufe eine Abnahme von PG und eine Zunahme von PI. Diese Verschiebung ist nicht spezifisch für die Silica-induzierte Lungenschädigung, sondern tritt auch bei verschiedenen anderen alveolären Schädigungen auf [51]. Eine durch diese Verschiebung veränderte biophysikalische Oberflächenaktivität wurde bisher mit keiner Methode gefunden [16].

Die hier durchgeführte Silica-Instillation reproduzierte damit die erwarteten makroskopischen und biochemischen Eigenschaften der durch diese Noxe induzierten Lungenschädigung. Im Anschluß an die biochemischen Messungen wurden Untersuchungen bisher unbekannter biophysikalischer Eigenschaften nach Silica-Instillation mit Hilfe von Adsorptionsversuchen, dynamischen Zyklen, Kompressibilitäts- und Stabilitätsmessungen vorgenommen. Diese Parameter zeigten insgesamt eine im Verlauf der Lungenschädigung gleichbleibende oder zunehmende

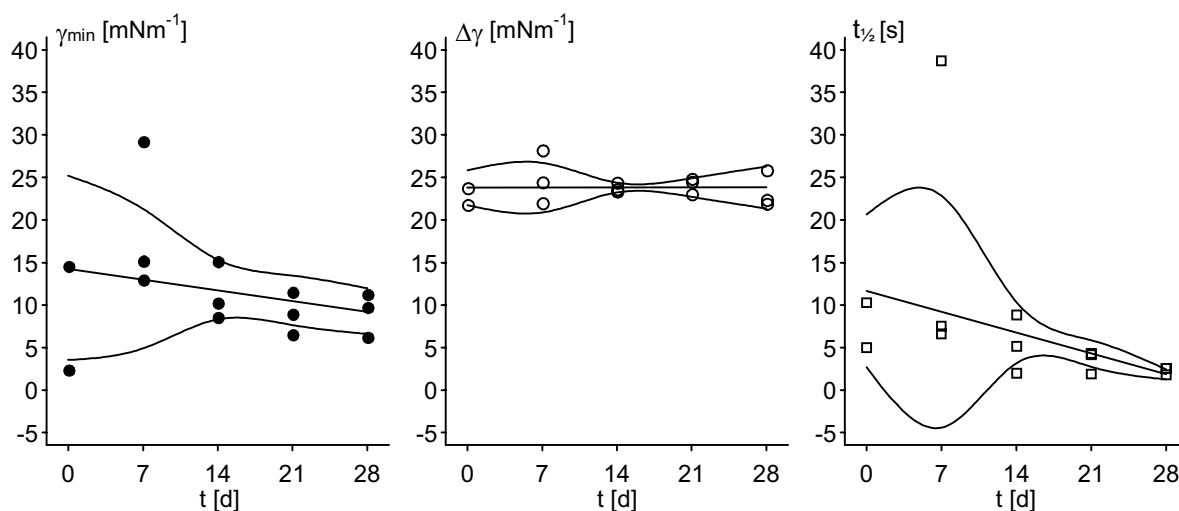


Abb. 34: Zusammenfassende Darstellung der Adsorption bei Lungenschädigung

Zusammenfassende Darstellung der Meßwerte in Adsorptionsversuchen mit Surfactant aus dem Lungenschädigungsmodell. Dargestellt werden die niedrigste Oberflächenspannung (γ_{\min} , links), Spanne zwischen beobachteter höchster und niedrigster Oberflächenspannung ($\Delta\gamma$, Mitte) und Halbwertzeit ($t_{1/2}$, rechts) nach t Tagen Lungenschädigung und bei Kontrolltieren (t=0). Gewichtete lineare Regression (Gerade) und 95 %-Konfidenzbereiche (Linien). Unter Berücksichtigung des Vorhersagefehlers erscheinen die niedrigste Oberflächenspannung und die Spanne mit andauernder Lungenschädigung unverändert, während die Halbwertzeit geringfügig abnimmt.

biophysikalischen Oberflächenaktivität an; im Einzelnen nahm die Halbwertzeit der Adsorption geringfügig ab, die Spanne der dynamischen Oberflächenspannungen war gleichbleibend gering, die Kompressibilität war niedrig und die Stabilität gleichbleibend hoch.

Die Adsorptionsversuche mit natürlichem Surfactant vor und nach Lungenschädigung sind in Abb. 34 zusammengefaßt. Die Darstellung zeigt, daß die Unterschiede der biophysikalischen Oberflächenaktivität im Verhältnis zur Dauer der Lungenschädigung nicht groß sind. In anfänglichen dynamischen Zyklen zeigte sich außerdem, daß Surfactants vor Lungenschädigung eine verringerte und schlechter reproduzierbare Oberflächenaktivität haben (Tab. 16, S. 77).

Diese Befunde, daß natürlicher Surfactant nach Lungenschädigung oberflächenaktiver ist als vor Lungenschädigung, sind im Zusammenhang mit der stark erhöhten Gesamtproteinkonzentration wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß auch mehr Surfactant-Proteine nach Lungenschädigung vorhanden sind und die Oberflächenaktivität steigern können (Tab. 12, S. 72). Die geringen biophysikalischen Unterschiede (Abb. 34, S. 101) allein unter den Surfactants nach verschiedenen langer Lungenschädigung (7–28 d) passen ebenso mit deren nur gering unterschiedlichen Proteinkonzentrationen zusammen. Zusätzlich zu dieser Begrün-

dung, für die es bisher keine systematischen Vergleichsdaten gibt, könnten die folgenden Erklärungen zutreffen: Bei allen Experimenten wurde aufgrund der begrenzten Probenmenge eine maximale Phospholipidkonzentration von nur 0.5 mgml^{-1} verwendet; die vorsichtige Probenaufarbeitung hat möglicherweise verhindert, daß die Phospholipidmenge vollständig zur Bildung des Oberflächenfilms zur Verfügung steht: Andere Untersuchungen zeigten bei einer Phospholipidkonzentration von nur 0.4 mgml^{-1} eine hohe Oberflächenaktivität [100], dazu wurden die Proben jedoch durch Sonifikation suspendiert. Dadurch entstehen stärker oberflächenaktive Ultrastrukturen, abhängig von der eingebrachten Energiemenge: multilamellare und unilamellare Vesikel [86] oder Phospholipid-Micellen [88]. Das hier eingesetzte Ultraschallbad ermöglicht im Gegensatz dazu lediglich eine bessere Dispersion des unlöslichen Surfactants [101].

Die biophysikalische Oberflächenaktivität des natürlichen Surfactants wird im folgenden mit den unlöslichen Surfactants (Kap. 9.3) und natürlichen Surfactants aus gesunden Kaninchen verglichen [83], da für die Silica-induzierte Lungenschädigung bisher keine Vergleichsdaten bekannt sind. Gegenüber den unlöslichen Surfactants haben die aus Lungenlavagen angereicherten Proben eine höhere biophysikalische Oberflächenaktivität. Dies zeigt ein Vergleich der Adsorptionsversuche, die insgesamt die kürzesten Halbwertzeiten hatten. Auch aufgrund der kleinsten Werte für die Spanne der Oberflächenspannung, die Kompressibilität und die Stabilität bei niedriger Oberflächenspannung unter dynamischen Zyklen übertraf der natürliche Surfactant die Ergebnisse der anderen Surfactants.

Gegenüber natürlichen Surfactants aus Kaninchen, die ebenfalls in einem Captive-Bubble-Surfactometer untersucht wurden [83], zeigten die eigenen Ergebnisse eine sehr gut vergleichbare Kompressibilität (Tab. 16, S. 77). Die publizierte Darstellung fand, wie zuvor dargestellt, in anfänglichen Kompressions-Expansions-Zyklen eine gegenüber folgenden Zyklen verringerte Oberflächenaktivität; in rund einem Fünftel der Experimente wurden keine niedrigen Oberflächenspannungen erreicht und diese Experimente nicht weitergeführt.

Zusammenfassend bestätigen die Untersuchungen des natürlichen Surfactants aus Silica-induzierter Lungenschädigung die These VIII: Die Silica-induzierte Lungenschädigung führte zeitabhängig zu einer intraalveolären gesteigerten Sekretion von Proteinen und Phospholipiden; eine biophysikalische Funktionsstörung dieses veränderten Surfactants tritt dabei nicht auf. Die Oberflächenaktivität dieses natürlichen Surfactants ist größer als die der anderen hier untersuchten unlöslichen Surfactants.

9.5 Abschließende Beurteilung der Versuche

In Hinsicht auf eine bewertende Beurteilung der Oberflächenaktivität unterschiedlicher Surfactants durch Testung im Captive-Bubble-Surfactometer scheinen die Versuche zur Adsorptionsmessung (Kap. 9.3.1), dynamische (Kap. 9.3.3) und quasi-statische Kompressions-Expansions-Zyklen (Kap. 9.3.2) eine unterschiedliche Bedeutung zu besitzen [91].

In Adsorptionsversuchen quantifiziert die Halbwertszeit dabei relativ zuverlässig die Adsorptionskinetik, setzt aber in zukünftigen Experimenten eine noch bessere Regelung der Oberflächen-Vergrößerung und geringere Störanfälligkeit gegenüber zusätzlichen Luftblasen voraus. Die weitere statistische Auswertung mehrerer Versuche, die hier beispielhaft für DPPC, KS und BLES (Abb. 32, S. 90) sowie natürlichen Surfactant (Abb. 34, S. 101) vorgestellt wurde, kann verschiedene Einflußgrößen der Adsorptionskinetik bestimmen.

In Experimenten mit dynamischen Kompressions-Expansions-Zyklen kann die Anzahl von Zyklen bis zum Erreichen einer minimalen Oberflächenspannung in einer automatisierbaren Versuchsanordnung leicht bestimmt werden (Abb. 19, S. 63), jedoch ist die mittelbare Bedeutung der dabei auftretenden Veränderung der Oberflächen-Zusammensetzung bisher unbekannt. Diese dynamischen Versuche können auch zum Vergleich mit Versuchen des Pulsierende-Blase-Surfactometer durchgeführt werden, das im Gegensatz zum Captive-Bubble-Surfactometer eine andauernde und schnelle Oberflächen-Veränderung voraussetzt [91].

Die Experimente mit quasi-statischen Zyklen im Captive-Bubble-Surfactometer können entsprechend den Zyklen in der Wilhelmy-Plattenmethode als Oberflächenspannungs-Oberflächen-Isothermen ausgewertet werden. Diese Isothermen komprimierter Monoschichten können genau vermessen werden (minimale und maximale Oberflächenspannung); die Kompressibilität und Stabilität können abgeleitet werden. Die größtmögliche Oberfläche, die unter Kompression durch Surfactant noch aufrecht erhalten wird, steht in direktem Bezug zur Stabilität von einzelnen Alveolen [99] und kann durch dynamische und quasi-statische Versuche bestimmt werden (Abb. 24, S. 69).

Zusätzlich wird der Oberflächenfilm unbekannter Zusammensetzung durch die Bestimmung der Hysteresefläche charakterisiert, die ein Maß für die Arbeit an der Oberfläche ist und auch von Adsorptionsvorgängen beeinflusst wird [21, 100]. Die Ergebnisse dieser hier untersuchten Eigenschaften mit grundlegender Bedeutung für die biophysikalischen Funktionen pulmonaler Surfactants werden in Abb. 35 (S. 104) zusammengefaßt.

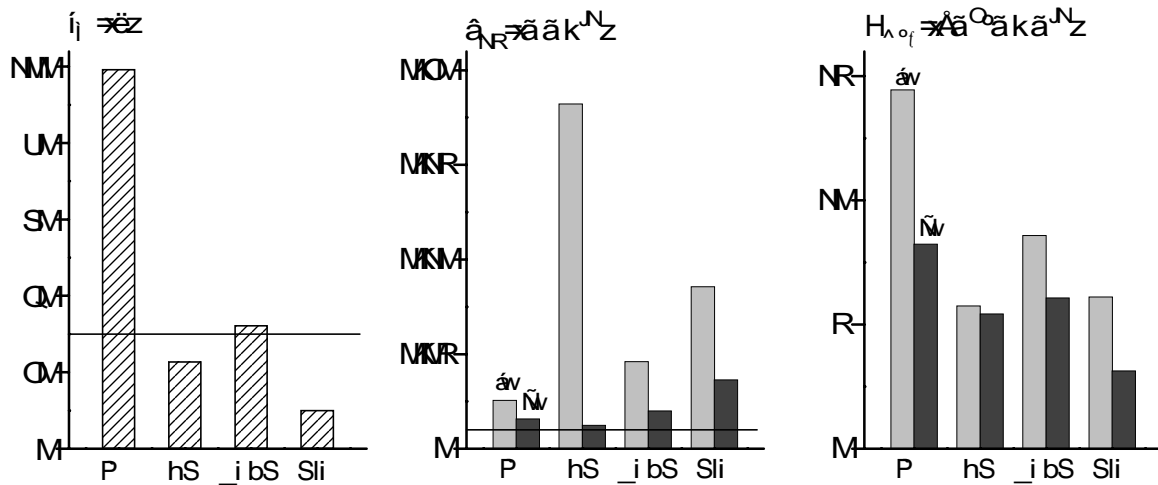


Abb. 35: Zusammenfassung biophysikalischer Eigenschaften der unlöslichen Surfactants

Adsorptionsgeschwindigkeit als Kompressibilität bei 15 mNm^{-1} Hysterese-Fläche ($H_{A-\gamma}$) in Halbwertzeit ($t_{1/2}$) der Adsorption. Approximierte Werte aus allen Versuchen bei einer Phospholipid-Konzentration von 0.2 mgml^{-1} (Balken) sowie Schätzwert für die Halbwertzeit des Druckausgleichs von erstmalig expandierenden Alveolen (Linie, nach [46]). Die Adsorption von Surfactants mißt die spontane Anreicherung einer Oberfläche, hier mit unlöslichen Molekülen aus der Subphase. PC zeigt die bekannte langsame Adsorption, während die anderen Surfactants schneller adsorbieren und mit der in vivo beobachteten Halbwertzeit korrespondieren.

in quasi-statischen Versuchen (Balken). Vergleich von initialen (iZ) mit folgenden Zyklen (fZ, meist dritter Zyklus) bei Phospholipid-Konzentrationen von 1.0 (PC, KS, BLES) und 0.5 mgml^{-1} (SIL). Wert einer DPPC-Monoschicht (Linie, nach [101]). Die Abnahme der Kompressibilität zeigt eine Veränderung der Zusammensetzung und so eine Steigerung gegen Verformung der Oberfläche an. PC kommt einer DPPC-Monoschicht nahe. Die komplexer zusammengesetzten Surfactants zeigen höhere Werte, die durch Kompressionen deutlich abnehmen.

quasi-statischen Versuchen (Balken). Initiale (iZ) und folgende Zyklen (fZ) bei Phospholipid-Konzentrationen von 1.0 (PC, KS, BLES) und 0.5 mgml^{-1} (SIL). Die Hysterese-Fläche ist ein Maß für die Arbeit, die zur Kompression und Expansion der Oberfläche aufgewendet werden muß, vergleichbar der Arbeit zur Senkung der Oberflächenspannung gegen einen Druckgradienten wie auch in Alveolen. Natürlicher Surfactant (SIL) zeigt geringste Werte, die bei allen Surfactants durch Veränderung der Zusammensetzung der Oberfläche (s. links) abnehmen.

Aus verschiedenen Untersuchungen mit der Wilhelmy-Plattenmethode und dem Captive-Bubble-Surfactometer wurden dazu grundlegende biophysikalische Anforderungen an therapeutische Surfactants abgeleitet [39, 99]: (a) Die Adsorption aus der Surfactant-Suspension soll innerhalb eines Atemzuges zu einem oberflächenaktiven Film führen; (b) die minimale Oberflächenspannung soll kleiner als 5 mNm^{-1} und die Kompressibilität 'niedrig' sein; (c) die spontane Desorption mit einem Anstieg der Oberflächenspannung soll langsam eintreten.

Die bisher bekannten in vitro-Untersuchungsergebnisse verschiedener therapeutischer Surfactants bezüglich dieser Eigenschaften haben, zusammengefaßt, nur

eine eingeschränkte Voraussagekraft für die *in vivo*-Wirkung [17, 45, 106]. Die Bedeutung der biophysikalischen Eigenschaften wurde zumindest für simulierte Atmungsvorgänge gezeigt [38]: langsame Adsorption führte zu einem instabilen Oberflächenfilm (a) mit hoher Oberflächenspannung (b), Alveolenkollaps und hohen erforderlichen Beatmungsdrücken; erhöhte spontane Desorption (c) verursachte stark wechselnde Oberflächenspannungen und verringerte die funktionelle Residualkapazität. Zusätzlich korrelierte die funktionelle Residualkapazität mit der Surfactant-Konzentration.

Die Beurteilung der hier untersuchten Surfactants (DPPC, KS, BLES und natürlicher Surfactant) folgt diesen Eigenschaften, die zwar allgemein akzeptiert sind, aber nur von wenigen Autoren berücksichtigt werden und nicht weiterentwickelt wurden [91]. Es wurde angenommen, daß diese Surfactants stellvertretend für unterschiedlichen Klassen von pulmonalen Surfactants eine abgestufte qualitative Beurteilung durch diese Arbeit erfahren können. Dazu werden die bereits dargestellten Ergebnisse unter dem Aspekt der Anforderungen an mögliche therapeutische Surfactants zusammengefaßt.

Natürlicher Surfactant zeigte die kürzeste Adsorptions-Halbwertzeit und schnellste Senkung der Oberflächenspannung in dynamischen Zyklen. Die Kompressibilität und Stabilität (Desorption) waren zu den anderen Surfactants vergleichbar niedrig. BLES (Alveofact) zeigte lediglich eine länger dauernde Adsorption und gering höhere Kompressibilität. KS (Exosurf) erreichte ebenfalls niedrige Oberflächenspannungen, aber adsorbierte langsamer und zeigte eine entsprechend hohe Oberflächenspannung in dynamischen Zyklen. DPPC wies eine vergleichbar niedrige Oberflächenspannung und Kompressibilität auf, adsorbierte aber deutlich langsamer (vgl. Abb. 35, S. 104).

Da die untersuchten Surfactants den dargestellten Eigenschaften nur teilweise genügten und deren Gewichtung unbekannt ist, können diese Ergebnisse nur wenig zu einer Beurteilung der vermuteten klinischen Wirksamkeit beitragen. Nichtsdestoweniger entsprechen die vorgestellten Meßwerte bekannten Ergebnissen bei künstlichen Surfactants [17, 43, 94]. Die unterschiedlichen Oberflächenaktivitäten der hier untersuchten Surfactants können dabei durch die verschiedenen Zusammensetzungen erklärt werden, da die Phospholipidkonzentrationen standardisiert wurden.

Alveofact enthielt als einziger der getesteten Surfactants SP-B und SP-C und zeigte hervorstechende Eigenschaften in der Adsorption: Schnellster (Halbwertzeit) Einbau der größten Menge oberflächenaktiven Materials (niedrigste Oberflächenspannung) in die Grenzfläche. Diese Ergebnisse entsprechen der beobach-

teten Wirkung von SP-B auf gemischte Phospholipid-Filme (Kap. 4.1.1, S. 16). Alveofact zeigte eine ähnlich hohe biophysikalische Oberflächenaktivität auch im Pulsierende-Blase-Surfactometer [106].

Exosurf beinhaltet Tyloxapol als Spreitungsvermittler für die Hauptkomponente DPPC. Tyloxapol sollte eine schnellere Adsorption gegenüber reinem DPPC-Surfactant bewirken, die hier auch während dynamischer Zyklen auftrat (kleine Spanne der Oberflächenspannung). Die Oberflächenaktivität von DPPC mit und ohne Hexadecanol war in anderen Experimenten nicht zu unterscheiden [43]. Hexadecanol ist dabei oberflächenaktiv, weil es wie DPPC wasserunlöslich ist und sich aufgrund der niedrigen Dichte (0.98 gml^{-1}) in der Wasser-Luft-Grenzfläche anreichert [21]. Ein Nachteil dieser Zusätze in Exosurf in Hinsicht auf die gemessene biophysikalische Oberflächenaktivität ist die auch von anderen beobachtete Beeinträchtigung der Stabilität der Grenzfläche bei niedriger Oberflächenspannung (vgl. Abb. 23, S. 67) [8] und der Kompressibilität (vgl. Abb. 35, S. 104). Obwohl die untersuchten künstlichen Surfactants wie dargelegt mit Hilfe des Captive-Bubble-Surfactometer qualifiziert werden können, ist ein erfolgreicher therapeutischer Einsatz wahrscheinlich von zahlreichen weniger gut meßbaren und intraindividuellen Einflüssen abhängig [17, 45, 107].

Es ist auch weiterhin nicht unumstritten, daß das Captive-Bubble-Surfactometer bei diesen pulmonalen Surfactants grundsätzlich die Oberflächenspannung gemäß physikalisch-chemischer Definition mißt, da diese Multischichten bilden und kinetische Energie enthalten können. Solche Meßwerte wurden pragmatisch als 'contractile force' [11] oder 'effektive Oberflächenspannung' bezeichnet, um so auch gemessene Werte unterhalb der Gleichgewichts-Oberflächenspannung im Verlauf der Isothermen abbilden zu können. Die hier vorgestellten Messungen werden durchgängig als Oberflächenspannung bezeichnet, weil theoretische Berechnungen und wiederholte Messungen pulmonaler Surfactants gegen unterschiedliche Oberflächen (Luft, Alkyle, Fluorocarbone) Meßwerte unterhalb der Gleichgewichts-Oberflächenspannung bestätigten [97, 103, 122].

Es ist allerdings nachgewiesen, daß das oberflächenaktive Material in Versuchen mit dem Captive-Bubble-Surfactometer tatsächlich solche Multischichten in der Nachbarschaft der Oberfläche bilden kann, die auch die Oberflächenspannung der Luftblase beeinflussen können [99]. Möglicherweise wird das Captive-Bubble-Surfactometer dadurch noch eher der Situation in vivo gerecht als andere Meßinstrumente, denn der pulmonale Surfactant bedeckt die Alveolen tatsächlich vollständig, kontinuierlich und in jeder Atemlage [14] mit Multischichten [102, 127]. Während der Atemzyklen beruht die physiologische Stabilität der Alveolen

auf der veränderlichen Oberflächenspannung (Kap. 4.2). Der Bezug der dargestellten Meßtechniken des Captive-Bubble-Surfactometers zu alveolären Vorgängen besteht weiterhin hauptsächlich in der Bestätigung und Kinetik dieser veränderlichen, niedrigen Oberflächenspannung.

Ein Captive-Bubble-Surfactometer wird aufgrund der vorgestellten, genau meßbaren und biophysikalisch relevanten Parameter als die derzeit beste in vitro-Meßtechnik zur Charakterisierung von pulmonalem Surfactant angesehen [84]. Diese Meßtechnik ermöglicht die Untersuchung sowohl von therapeutischen ('exogenen') Surfactants als auch von Surfactant-Proben, die beispielsweise durch bronchoalveoläre Lavage gewonnen wurden. Dabei könnte bei Patienten eine gestörte Surfactant-Funktion während einer Lungenerkrankung möglicherweise genauer definiert und verfolgt werden. Diese Meßtechnik könnte andererseits auch die Wirksamkeit pharmazeutischer Surfactant-Präparate nachweisen und die bisher notwendigen, chargenweisen Qualitätskontrollen mit Versuchsreihen an unreif geborenen Tieren durch in vitro-Untersuchungen ersetzen.

Diese abschließende Beurteilung zeigte die wesentlichen technischen Vorteile, Meß- und Auswertmöglichkeiten, Versuchsinterpretationen und experimentellen Bedeutungen des Captive-Bubble-Surfactometers, nachdem dieses Meßinstrument im Rahmen dieser Arbeit zur Untersuchung von löslichem, unlöslichen und natürlichen Surfactants aufgebaut und eingesetzt wurde.

10 Zusammenfassung und Ausblick

Die biophysikalische Oberflächenaktivität von pulmonalen Surfactants konnte mit den bisher zur Verfügung stehenden Methoden nur unter beschränkten Bedingungen und mit Artefakten getestet werden. Mit herkömmlichen Blasenmethoden konnten orientierende Untersuchungen an kleinen, gekrümmten Oberflächen unter völlig statischen oder dynamischen Bedingungen durchgeführt werden, aber erst das Captive-Bubble-Surfactometer, eine neuere Blasenmethode, die unbeeinträchtigte Oberflächen untersucht, ermöglichte es, biophysikalisch relevante Oberflächeneigenschaften sicher zu analysieren.

Mit diesem im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgebauten und eingesetzten Instrument konnte die Oberflächenspannung löslicher Surfactants mit großer Genauigkeit bestimmt werden. Ferner ließen sich biologisch charakteristische Surfactants mit Hilfe dieses Meßgerätes hinsichtlich ihrer Oberflächenaktivität voneinander differenzieren. Sie zeigten unterschiedliche Adsorptionskinetiken, Kompressibilitäten sowie Oberflächenspannungen im Verlauf von quasi-statischen und dynamischen Kompressions-Expansions-Zyklen.

Der erhöhte methodische Aufwand gegenüber einigen Methoden zur Messung der Oberflächenaktivität wird durch die bessere Aussagekraft für biophysikalische Oberflächeneigenschaften gerechtfertigt. Eine geringere maximale Genauigkeit im Vergleich zu statischen Methoden tritt hinter die hohe Praktikabilität der dynamischen Untersuchung von metastabilen Zuständen mit minimaler Oberflächenspannung zurück. Der tatsächliche molekulare Aufbau der Grenzfläche läßt sich allerdings auch mit dem Captive-Bubble-Surfactometers nicht klären. Ein Einsatz dieser Meßmethode in einer Routine-Testung könnte auch zum besseren Verständnis von Surfactant-Funktionsstörungen bei bestimmten Patienten und zur Vermeidung von Tierversuchen mit therapeutischen Surfactants beitragen.

Nachdem Pattle 1957 auf einfachste Weise eine Oberflächenspannung von weniger als 1 mNm^{-1} durch Untersuchung von Lavagen ermittelte und die Herkunft und wesentliche Bedeutung des schäumenden Materials aus der Lunge für die Stabilität der gasaustauschenden Fläche erkannte, ist das Captive-Bubble-Surfactometer heute eine fortgeschrittene Methode, deren Untersuchungsmöglichkeiten noch auszuschöpfen sind.

11 Referenzen

1. Adamson A.W.: Surface films on liquid substrates. In: *Physical chemistry of surfaces*. Wiley, New York 1976, 109-111
2. Ashbaugh D.G., D.B. Bigelow, T.L. Petty et al.: Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967; 319-323
3. Atkins P.W.: Oberflächenspannung und Detergenzien. In: *Physikalische Chemie*. VCH, Weinberg 1990, 649-650
4. Avery M.E. und J. Mead: Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *Am.J.Dis.Child* 1959, 97: 517-523
5. Baatz J.E., B. Elledge und J.A. Whitsett: Surfactant protein SP-B induces ordering at the surface of model membrane bilayers. *Biochemistry* 1990, 29: 6714-6720
6. Bachofen H.: Warum ist die Lunge trocken? *Schweiz.Med.Wochenschr.* 1991, 121: 1523-1529
7. Bachofen H., S. Schürch, R.P. Michel & al.: Experimental hydrostatic pulmonary edema in rabbit lungs. *Morphology. Am.Rev.Respir.Dis.* 1993, 147: 989-996
8. Bachofen H., S. Schürch und F. Possmayer: Disturbance of alveolar lining layer: effects on alveolar microstructure. *Journal of Applied Physiology* 1994, 76: 1983-1992
9. Bachofen H., S. Schürch, M. Urbinelli et al.: Relations among alveolar surface tension, surface area, volume, and recoil pressure. *Journal of Applied Physiology* 1987, 62: 1878-1887
10. Bangham A.D.: Lung surfactant: how it does and does not work. *Lung* 1987, 165: 17-25
11. Bangham A.D., C.J. Morley und M.C. Phillips: The physical properties of an effective lung surfactant. *Biochim.Biophys.Acta* 1979, 573: 552-556
12. Barrow R.E. und B.A. Hills: A critical assessment of the Wilhelmy method in studying lung surfactants. *J.Physiol.Lond.* 1979, 295: 217-227
13. Bartlett G.R.: Phosphorous assay in column chromatography. *Journal of Biology and Chemistry* 1959, 234: 466-468
14. Bastacky J., C.Y.C. Lee, J. Goerke et al.: Alveolar lining layer is thin and continuous: low-temperature scanning electron microscopy of rat lung. *Journal of Applied Physiology* 1995, 79: 1615-1628
15. Batenburg J.J.: Surfactant phospholipids: synthesis and storage. *Am.J.Physiol.* 1992, 262: L367-L385
16. Beppu O.S., J.A. Clements und J. Goerke: Phosphatidylglycerol-deficient lung surfactant has normal properties. *Journal of Applied Physiology* 1983, 55: 496-502
17. Boncuk-Dayanikli P. und H.W. Taeusch: Essential and nonessential constituents of exogenous surfactants. In: *Surfactant therapy for lung disease*. Robertson B. und H.W. Taeusch (Hrsg). Marcel Dekker, New York 1995, 217-238
18. Brezesinski G. und H.-J. Mögel: Unlösliche Grenzflächenfilme. In: *Grenzflächen und Kolloide*. Brezinski G. und H.-J. Mögel (Hrsg). Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1993, 63-64
19. Brown E.S.: Lung area from surface tension effects. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* 1957, 95: 168-170
20. Bünger H. und U. Pison: Quantitative analysis of pulmonary surfactant phospholipids by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection. *J.Chromatogr.B Biomed.Appl.* 1995, 672: 25-31

21. Chang C.-H. und E.I. Franses: Dynamic surface tension behavior of aqueous octanol solutions under constant-area and pulsating-area conditions. *Chemical Engineering Science* 1994, 49: 313-325
22. Clark J.C., S.E. Wert, C.J. Bachurski et al.: Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice. *Proceedings of the National Academy of Science in the USA* 1995, 92: 7794-7798
23. Clements J.A.: Surface tension of lung extracts. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* 1957, 95: 170-172
24. Cochrane C.G. und S.D. Revak: Pulmonary surfactant protein B (SP-B): structure-function relationships. *Science* 1991, 254: 566-568
25. Cockshutt A.M., J. Weitz und F. Possmayer: Pulmonary surfactant-associated protein A enhances the surface activity of lipid extract surfactant and reverses inhibition by blood proteins in vitro. *Biochemistry* 1990, 29: 8424-8429
26. Colacicco G., M.K. Basu und E.M. Scarpelli: pH, temperature, humidity and the dynamic force-area curve of dipalmitoyl lecithin. *Respir.Physiol.* 1976, 27: 169-186
27. Comroe J.H.: Premature science and immature lungs. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1977, 116: 127-135
28. Daniels C.B., S. Orgeig und A.W. Smits: The composition and function of reptilian pulmonary surfactant. *Respiration Physiology* 1995, 102: 121-135.
29. Dethloff L.A., L.B. Gilmore, A.R. Brody et al.: Induction of intra- and extra-cellular phospholipids in the lungs of rats exposed to silica. *Biochem.J.* 1986, 233: 111-118
30. Eijking E.P., D. Gommers, K.L. So et al.: A model for acute respiratory failure induced by tracheal instillation of homologous plasma or protein rich pulmonary oedema fluid. *Applied Cardiopulmonary Pathophysiology* 1995, 5: 129-134.
31. Engeln-Müllges G. und F. Reutter: Polynomiale und rationale Interpolation. In: *Formelsammlung zur numerischen Mathematik mit QuickBASIC-Programmen*. PI Wissenschaftsverlag, Mannheim 1991, 213-235
32. Enhorning G.: Pulsating bubble technique for evaluating pulmonary surfactant. *Journal of Applied Physiology* 1977, 43: 198-203
33. Espinosa F.F., A.H. Shapiro, J.J. Fredberg et al.: Spreading of exogenous surfactant in an airway. *Journal of Applied Physiology* 1993, 75: 2028-2039
34. Folch J., M. Lees und G.H. Stanley: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biology and Chemistry* 1957, 228: 497-509
35. Gehr P., M. Geiser, V. Im Hof et al.: Surfactant and inhaled particles in the conducting airways: structural, stereological, and biophysical aspects. *Microsc.Res.Tech.* 1993, 26: 423-436
36. Gil J.: Histological preservation and ultrastructure of alveolar surfactant. *Annu.Rev.Physiol.* 1985, 47: 753-763
37. Gilliard N., G.P. Heldt, J. Loredó et al.: Exposure of the hydrophobic components of porcine lung surfactant to oxidant stress alters surface tension properties. *J.Clin.Invest.* 1994, 93: 2608-2615
38. Goerke J.: Prediction of mechanical responses to surfactant therapy. In: *Surfactant therapy for lung disease*. Robertson B. und H.W. Taeusch (Hrsg). Marcel Dekker, New York 1995, 349-369

39. Goerke J. und J.A. Clements: Alveolar surface tension and lung surfactant. In: *Handbook of Physiology*. Fishman A.P., P.T. Macklem, J. Mead et al. (Hrsg). American Physiological Society, Bethesda 1986, 247-262
40. Gommers D., C. Vilstrup, J.A.H. Bos et al.: Exogenous surfactant therapy increases static lung compliance, and cannot be assessed by measurement of dynamic compliance alone. *Critical Care Medicine* 1993, 21: 567-574
41. Haddad I.Y., B.A. Holm, L. Hlavaty et al.: Dependence of surfactant function on extracellular pH: mechanisms and modifications. *Journal of Applied Physiology* 1994, 76: 657-662
42. Hall S.B., M.S. Bermel, Y.T. Ko et al.: Approximations in the measurement of surface tension on the oscillating bubble surfactometer. *Journal of Applied Physiology* 1993, 75: 468-477
43. Hall S.B., A.R. Venkitaraman, J.A. Whitsett et al.: Importance of hydrophobic apoproteins as constituents of clinical exogenous surfactants. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1992, 145: 24-30
44. Hallman M., T.A. Merritt, T. Akino et al.: Surfactant protein A, phosphatidylcholine, and surfactant inhibitors in epithelial lining fluid. Correlation with surface activity, severity of respiratory distress syndrome, and outcome in small premature infants. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1991, 144: 1376-1384
45. Hallman M., T.A. Merritt und K. Bry: The fate of exogenous surfactant in neonates with respiratory distress syndrome. *Clin.Pharmacokinet.* 1994, 26: 215-232
46. Hawgood S.: Surfactant: Composition, Structure, and Metabolism. In: *The Lung: Scientific Foundations*. Crystal R.G. und J.B. West (Hrsg). Raven Press Ltd., New York 1991, 247-261
47. Hawgood S. und K. Shiffer: Structures and properties of the surfactant-associated proteins. *Annu.Rev.Physiol.* 1991, 53: 375-394
48. Hildebran J.N., J. Goerke und J.A. Clements: Pulmonary surface film stability and composition. *Journal of Applied Physiology* 1979, 47: 604-611
49. Hills B.A.: Rapidly alternating curvature ("oil canning") as a mechanism preventing alveolar edema. *Journal of Applied Physiology* 1992, 72: 2108-2111
50. Jobe A.H. und M. Ikegami: Surfactant treatment of respiratory distress syndrome. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1987, 136: 1256-1275
51. Kawada H., T. Horiuchi, J.M. Shannon et al.: Alveolar type II cells, surfactant protein A (SP-A), and the phospholipid components of surfactant in acute silicosis in the rat. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1989, 140: 460-470
52. Korfhagen T.R., M.D. Bruno, G.F. Ross et al.: Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996, 93: 9594-9599
53. Kwork D.Y. und A.W. Neumann: Contact angle measurements by axisymmetric drop shape analysis (ADSA). 1995 [Abstract]
54. Lesur O., R.A. Veldhuizen, J.A. Whitsett et al.: Surfactant-associated proteins (SP-A, SP-B) are increased proportionally to alveolar phospholipids in sheep silicosis. *Lung* 1993, 171: 63-74
55. Lewis J.F., M. Ikegami und A.H. Jobe: Altered surfactant function and metabolism in rabbits with acute lung injury. *Journal of Applied Physiology* 1990, 69: 2303-2310
56. Lewis J.F. und A.H. Jobe: Surfactant and the Adult Respiratory Distress Syndrome. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1993, 147: 218-233

57. Liau D.F., C. Redington Barrett, A.L. Loomis Bell et al.: Functional abnormalities of lung surfactant in experimental acute alveolar injury in the dog. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1987, 136: 395-401
58. Lide D.R.: Surface tension. In: *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. Lide D.R. (Hrsg). CRC Press, Boca Raton 1992, 9-117
59. Luginbuhl R.C. und S.D. Schlotzhauer: The GLM procedure. In: *SAS/STAT Guide for personal computers version 6 edition*. Parker J.C. und K.P. Ingraham (Hrsg). SAS Institute, Cary 1987, 549-640
60. Magoon M.W., J.R. Wright und A. Baritussio: Subfractionation of lung surfactant: implications for metabolism and surface activity. *Biochim.Biophys.Acta* 1983, 750: 18-31
61. Malcom J.D. und C.D. Elliot: Interfacial tension from height and diameter of a single sessile drop or captive bubble. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 1980, 58: 151-153
62. Massaro D., L. Clerch und G.D. Massaro: Surfactant aggregation in rat lungs: influence of temperature and ventilation. *Journal of Applied Physiology* 1981, 51: 646-653
63. Max M., U. Pison, R.G. Spragg et al.: Incidence and survival of ARDS analyzed by genotyping for the 6A gene of surfactant protein A (SP-A). 1995 [Abstract]
64. Mercer R.R., M.L. Russell und J.D. Crapo: Alveolar septal structure in different species. *Journal of Applied Physiology* 1994, 77: 1060-1066
65. Mizuno K., M. Ikegami, C.-M. Chen et al.: Surfactant Protein-B supplementation improves in vivo function of a modified natural surfactant. *Pediatr.Res.* 1995, 37: 271-275
66. Moore W.J. und D.O. Hummel: Grenzflächen. In: *Physikalische Chemie*. deGruyter, Berlin 1986, 572-595
67. Naureckas E.T., C.A. Dawson, B.S. Gerber et al.: Airway reopening pressure in isolated rat lungs. *Journal of Applied Physiology* 1994, 76: 1372-1377
68. Nogee L.M., D.E. deMello, L.P. Dehner et al.: Brief report deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *New England Journal of Medicine* 1993, 328: 406-410
69. Obladen M., D. Popp, C. Schdl et al.: Studies on lung surfactant replacement in respiratory distress syndrome. Rapid film formation from binary mixed liposomes. *Biochim.Biophys.Acta* 1983, 735: 215-224
70. Oosterlaken-Dijksterhuis M.A., H.P. Haagsman, L. van Golde et al.: Characterization of lipid insertion into monomolecular layers mediated by lung surfactant proteins SP-B and SP-C. *Biochemistry* 1991, 30: 10965-10971
71. Otis D.R., Jr., M. Johnson, T.J. Pedley et al.: Role of pulmonary surfactant in airway closure: a computational study. *Journal of Applied Physiology* 1993, 75: 1323-1333
72. Oulton M., J. MacDonald, D.T. Janigan et al.: Mouse alveolar surfactant: characterization of subtypes prepared by differential centrifugation. *Lipids* 1993, 28: 715-720
73. Pastrana Rios B., C.R. Flach, J.W. Brauner et al.: A direct test of the "squeeze-out" hypothesis of lung surfactant function. External reflection FT-IR at the air/water interface. *Biochemistry* 1994, 33: 5121-5127
74. Pattle R.E.: Properties, function, and origin of the alveolar lining layer. *Proceedings of the Royal Society* 1958, 148: 217-240
75. Pattle R.E. und C.C. Kratzing: Maturity of fetal lungs tested by production of stable microbubbles in amniotic fluid. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1979, 86: 615-622

76. Petrov P. und P. Joos: Linear compression of an adsorbed monolayer of a surfactant solution. *Journal of Colloid and Interface Science* 1996, 181: 530-541
77. Pison U., J. Böck, S. Pietschmann et al.: The adult respiratory distress syndrome: pathophysiological concepts related to the pulmonary surfactant system. In: *Surfactant therapy for lung disease*. Robertson B. und H.W. Taeusch (Hrsg). Marcel Dekker, New York 1995, 167-197
78. Pison U., R. Herold und S. Schürch: The pulmonary surfactant system: components, biological actions, and alterations during lung diseases. *Colloids Surfaces A* 1996, 114: 165-184
79. Pison U., M. Max, A. Neuendank et al.: Host defence capacities of pulmonary surfactant: evidence for 'non-surfactant' functions of the surfactant system. *European Journal of Clinical Investigation* 1994, 24: 586-599
80. Pison U., U. Obertacke, W. Seeger et al.: Surfactant protein A (SP-A) is decreased in acute parenchymal lung injury associated with polytrauma. *European Journal of Clinical Investigation* 1992, 22: 712-718
81. Pison U., K. Shiffer, S. Hawgood et al.: Effects of the surfactant-associated proteins, SP-A, SP-B and SP-C, on phospholipid film formation. *Progress in Respiratory Research* 1990, 25: 271-273
82. Press W.H., B.P. Flannery, S.A. Teukolsky et al.: Modeling of data. In: *Numerical recipes in pascal*. Cambridge University Press, Cambridge, USA 1992, 590-598
83. Putz G., J. Goerke und J.A. Clements: Surface activity of rabbit pulmonary surfactant subfractions at different concentrations in a captive bubble. *Journal of Applied Physiology* 1994, 77: 597-605
84. Putz G., J. Goerke, S. Schürch et al.: Evaluation of pressure-driven captive bubble surfactometer. *Journal of Applied Physiology* 1994, 76: 1417-1424
85. Putz G., J. Goerke, H.W. Taeusch et al.: Comparison of captive and pulsating bubble surfactometers with use of lung surfactants. *Journal of Applied Physiology* 1994, 76: 1425-1431
86. Putz G. und H.P. Haagsman: Hydrophobic surfactant protein-lipid interactions in a captive bubble. 1995 [Abstract]
87. Putz G. und S. Schürch: Biophysikalische Eigenschaften von Surfactant. 1995 [Abstract]
88. Qiu R. und R.C. MacDonald: A metastable state of high surface activity produced by sonication of phospholipids. *Biochim.Biophys.Acta* 1994, 1191: 343-353
89. Radford E.P.: Method for estimating respiratory surface area in mammalian lungs from their physical characteristics. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* 1954, 87: 58-63
90. Reifenrath R.: The significance of alveolar geometry and surface tension in the respiratory mechanics of the lung. *Respir.Physiol.* 1975, 24: 115-137
91. Robertson B.: Experimental models for evaluation of exogenous surfactants. In: *Surfactant therapy for lung disease*. Robertson B. und H.W. Taeusch (Hrsg). Marcel Dekker, New York 1995, 239-267
92. Robertson B., T. Kobayashi, M. Ganzuka et al.: Experimental neonatal respiratory failure induced by a monoclonal antibody to the hydrophobic surfactant-associated protein SP-B. *Pediatr.Res.* 1991, 30: 239-243

93. Rotenberg Y., L. Boruvka und A.W. Neumann: Determination of surface tension and contact angle from the shapes of axisymmetric fluid interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 1983, 93: 169-183
94. Scarpelli E.M., E. David, M. Cordova et al.: Surface tension of therapeutic surfactants (Exosurf neonatal, Infasurf, and Survanta) as evaluated by standard methods and criteria. *Am.J.Perinatol.* 1992, 9: 414-419
95. Scarpelli E.M. und A.J. Mautone: Surface biophysics of the surface monolayer theory is incompatible with regional lung function. *Biophys.J.* 1994, 67: 1080-1089
96. Schoel W.M., S. Schürch und J. Goerke: The captive bubble method for the evaluation of pulmonary surfactant: surface tension, area, and volume calculations. *Biochim.Biophys.Acta* 1994, 1200: 281-290
97. Schürch S.: Surface tension at low lung volumes: dependence on time and alveolar size. *Respir.Physiol.* 1982, 48: 339-355
98. Schürch S.: Surface tension properties of surfactant. *Clin.Perinatol.* 1993, 20: 669-682
99. Schürch S. und H. Bachofen: Biophysical aspects in the design of a therapeutic surfactant. In: *Surfactant therapy for lung disease*. Robertson B. und H.W. Taeusch (Hrsg). Marcel Dekker, New York 1995, 3-32
100. Schürch S., H. Bachofen, J. Goerke et al.: Surface properties of rat pulmonary surfactant studied with the captive bubble method: adsorption, hysteresis, stability. *Biochim.Biophys.Acta* 1992, 1103: 127-136
101. Schürch S., H. Bachofen, J. Goerke et al.: A captive bubble method reproduces the in situ behavior of lung surfactant monolayers. *Journal of Applied Physiology* 1989, 67: 2389-2396
102. Schürch S., H. Bachofen, R. Quanbar et al.: Incorporation of surface-associated surfactant material into the surface active film. 1995 [Abstract]
103. Schürch S., J. Goerke und J.A. Clements: Direct determination of volume- and time-dependence of alveolar surface tension in excised lungs. *Proceedings of the National Academy of Science in the USA* 1978, 75: 3417-3421
104. Schürch S., F. Possmayer, S. Cheng et al.: Pulmonary SP-A enhances adsorption and appears to induce surface sorting of lipid extract surfactant. *Am.J.Physiol.* 1992, 263: L210-L218
105. Schürch S., D. Schürch, T. Curstedt et al.: Surface activity of lipid extract surfactant in relation to film area compression and collapse. *Journal of Applied Physiology* 1994, 77: 974-986
106. Seeger W., C. Grube, A. Günther et al.: Surfactant inhibition by plasma proteins: differential sensitivity of various surfactant preparations. *Eur.Respir.J.* 1993, 6: 971-977
107. Segerer H., P. Stevens, B. Schadow et al.: Surfactant substitution in ventilated very low birth weight infants: factors related to response types. *Pediatr.Res.* 1991, 30: 591-596
108. Shiffer K., S. Hawgood, H.P. Haagsman et al.: Lung surfactant proteins, SP-B and SP-C, alter the thermodynamic properties of phospholipid membranes: a differential calorimetry study. *Biochemistry* 1993, 32: 590-597
109. Slama H., W. Schoedel und E. Hansen: Bestimmung der Oberflächeneigenschaften von Stoffen aus den Lungenalveolen mit einer Blasenmethode. *Pflügers Archive* 1971, 322: 355-363
110. Smith P.K., R.J. Krohn, G.T. Hermanson et al.: Measurement of protein using bichinonic acid. *Analytical Biochemistry* 1985, 150: 76-85

111. Stevens P.A., J.R. Wright und J.A. Clements: Changes in quantity, composition, and surface activity of alveolar surfactant at birth. *Journal of Applied Physiology* 1987, 63: 1049-1057
112. Sun B., T. Curstedt und B. Robertson: Surfactant inhibition in experimental meconium aspiration. *Acta Paediatr.* 1993, 82: 182-189
113. Suzuki Y., Y. Fujita und K. Kogishi: Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1989, 140: 75-81
114. Taneva S.G. und K.M. Keough: Dynamic surface properties of pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C and their mixtures with dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochemistry* 1994, 33: 14660-14670
115. van Golde L., J.J. Batenburg und B. Robertson: The pulmonary surfactant system. *News in the Physiological Sciences* 1994, 9: 13-20
116. Vincent J.S., S.D. Revak, C.D. Cochrane et al.: Interactions of model human pulmonary surfactants with a mixed phospholipid bilayer assembly: Raman spectroscopic studies. *Biochemistry* 1993, 32: 8228-8238
117. von Neergard K.: Neue Auffassung über einen Grundbegriff der Atemmechanik. Die Retraktionskraft der Lunge, abhängig von der Oberflächenspannung der Alveolen. *Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin* 1929, 66: 373-394
118. von Szyszkowski B.: Experimentelle Studien über kapillare Eigenschaften der wässrigen Lösungen von Fettsäuren. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 1908, 2: 385-414
119. Werner J.: Klassische Tests. In: *Biomathematik und medizinische Statistik*. Urban & Schwarzenberg, München 1992, 145-147
120. Williams M.C.: Vesicles within vesicles: what role do multivesicular bodies play in alveolar type II cells? *Am.Rev.Respir.Dis.* 1987, 135: 744-746
121. Williams M.C., S. Hawgood und R.L. Hamilton: Changes in lipid structure produced by surfactant proteins SP-A, SP-B, and SP-C. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1991, 5: 41-50
122. Wilson T.A. und H. Bachofen: A model for mechanical structure of the alveolar duct. *Journal of Applied Physiology* 1982, 52: 1064-1070
123. Wirtz H. und M. Schmidt: Ventilation and secretion of pulmonary surfactant. *Clin. Investig.* 1992, 70: 3-13
124. Wohlford Lenane C.L. und J.M. Snyder: Localization of surfactant-associated proteins SP-A and SP-B mRNA in rabbit fetal lung tissue by in situ hybridization. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1992, 7: 335-343
125. Wright J.R. und L.G. Dobbs: Regulation of pulmonary surfactant secretion and clearance. *Annu.Rev.Physiol.* 1991, 53: 395-414
126. Yu S.H. und F. Possmayer: Adsorption, compression and stability of surface films from natural, lipid extract and reconstituted pulmonary surfactants. *Biochim.Biophys.Acta* 1993, 1167: 264-271
127. Yu S.H. und F. Possmayer: Pulmonary surfactant monolayers and multilayers. 1995 [Abstract]

12 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Seite
1. Funktionsprinzip des Captive-Bubble-Surfactometers	14
2. Alveole und Surfactant	22
3. Entwicklungsschritte des Captive-Bubble-Surfactometers	31
4. Captive-Bubble-Surfactometer: Seitenansicht	34
5. Captive-Bubble-Surfactometer: Schemazeichnung	34
6. Bildverarbeitung: Digitalisierung einer Luftblase	49
7. Bildverarbeitung: Bestimmung der Blasenabmessungen	49
8. Funktionswerte der Approximationen bei unterschiedlicher Blasengeometrie	50
9. Oberflächenspannungen bei unterschiedlicher Blasengröße	50
10. Temperaturregelung: Heizungssystem II	54
11. Auswirkung fehlerhafter Blasenvermessung auf die Oberflächenspannung	54
12. Untersuchung der Blasensymmetrie	55
13. Gesamtfehler der Messung der Oberflächenspannung	55
14. Oberflächenspannungen von löslichen Surfactants	58
15. Blasengeometrie zu Versuchsbeginn	58
16. Adsorptionsverlauf von DPPC	60
17. Quasi-statische Zyklen von DPPC	60
18. Quasi-statische Zyklen mit Suspensionen von DPPC	62
19. Dynamische Zyklen verschiedener Surfactant-Suspensionen	63
20. Adsorptionsverlauf von künstlichem Surfactant	64
21. Adsorptionsverlauf von bovinem Lipid-Extraktions-Surfactant	64
22. Vergleich zwischen quasi-statischen und dynamischen Zyklen mit künstlichem Surfactant	66
23. Stabilität von künstlichem Surfactant	67
24. Oberflächenkompression während dynamischer Zyklen	69
25. Vergleich zwischen quasi-statischen und dynamischen Zyklen mit bovinem Lipid-Extraktions-Surfactant	70
26. Steuerung der Oberflächen- expansion in Adsorptionsversuchen	74
27. Zeitliche Veränderung der Verteilung der Phospholipide	74
28. Natürlicher Surfactant von Kontrolltieren	76
29. Natürlicher Surfactant nach 28 Tagen Lungenschädigung	76
30. Übersicht aller Experimente zur Messung der Oberflächenaktivität	80
31. Adsorptionsverhalten von DPPC, KS und BLES	90
32. Einflußgrößen auf das Adsorptionsverhalten	90
33. Kompressions-Isotherme	92
34. Zusammenfassende Darstellung der Adsorption bei Lungenschädigung	101
35. Zusammenfassung biophysikalischer Eigenschaften der unlöslichen Surfactants	104

13 Tabellenverzeichnis

Tabelle	Seite
1. Lipide im pulmonalen Surfactant	18
2. Ultrastrukturen des pulmonalen Surfactants: Inhaltsstoffe, Morphologie, Vorkommen und Oberflächenaktivität	20
3. Allgemeine Übersicht über die verschiedenen Versuchsprotokolle	46
4. Meßpunkte Versuchsprotokollen zur Adsorptions- und Stabilitätsmessung	46
5. Meßpunkte in quasi-statischen und dynamischen Versuchsprotokollen	46
6. Steuerungsdrücke in quasi-statischen Versuchsprotokollen	46
7. Koeffizienten für die interpolierende polynomiale Kurvenanpassungen	48
8. Oberflächenspannung unterschiedlicher Konzentrationen von Ethanol in Wasser	57
9. Quasi-statische Zyklen mit Suspensionen von DPPC	62
10. Adsorptionsverhalten von künstlichem Surfactant	65
11. Adsorptionsverhalten von bovinem Lipid-Extraktions-Surfactant	68
12. Biochemische Charakteristika von Lungen und Lungenlavage-Proben im Verlauf einer Silica-induzierten Lungenschädigung	72
13. Verteilung der Phospholipide in unkonzentrierten Lungenlavage-Proben im Verlauf einer Silica-induzierten Lungenschädigung	73
14. Verteilung der Phospholipide in konzentrierten Lungenlavage-Proben im Verlauf einer Silica-induzierten Lungenschädigung	73
15. Adsorptionsmessungen mit natürlichem Surfactant im Verlauf einer Silica-induzierten Lungenschädigung	75
16. Dynamische Zyklen mit natürlichem Surfactant im Verlauf einer Silica-induzierten Lungenschädigung	77
17. Stabilität von natürlichem Surfactant im Verlauf einer Silica-induzierten Lungenschädigung	77

14 Abkürzungen

ρ	spezifisches Gewicht
$\gamma_{(\min, \max)}$	Oberflächenspannung
A	Oberfläche
BLES	Boviner Lipid-Extraktions-Surfactant
c	Konzentration
DPPC	L- α -Dipalmitoylphosphatidylcholin (Lecithin)
E	Proteinkonzentration
FS	Fettsäuren
H	Hysterese
$k_{(a)}$	Kompressibilität (bei $a \text{ mNm}^{-1}$)
KG	Körpergewicht
KS	Künstlicher Surfactant
m	Feuchtwicht
n	Anzahl
P	Phosphatkonzentration
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerin
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipidkonzentration
PS	Phosphatidylserin
RLL	Lavagen von Rattenlungen nach Silica-induzierter Schädigung
SP-A/B/C	Surfactant-Protein A/B/C
t	Zeit
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
V	Volumen
z	Zykluszahl

15 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich für die Anregung, Finanzierung des Captive-Bubble-Surfactometers, Betreuung und kontinuierliche Unterstützung dieser Arbeit bei Herrn Dr. Ulrich Pison.

Ich danke ebenfalls herzlich

Herrn Klaus Dannenberg	für die Ausführung und mehrere Veränderungen des Captive-Bubble-Surfactometers,
Frau Margarita Pettersson	für alle Hilfe in labortechnischen Fragen,
Herrn Dr. Harald Bünger	für die Entwicklung der HPLC,
Frau Renate Tschiersch	für die Durchführung der HPLC,
Herrn Dr. Günther Putz	für anregende Diskussionen,
Herrn Prof. Samuel Schürch	für weitere Inspiration und viele Hinweise und
Herrn Peter Baehr	für den Schaltungsentwurf des zweiten Heizsystems.

16 Lebenslauf

Geburtsdatum: 2. Februar 1967
 Geburtsort: Essen
 Abitur: Don-Bosco-Gymnasium der Salesianer, Essen, 1986

Universitärer Werdegang

Oktober 1987 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
 Oktober 1991 Wechsel an die Freie Universität Berlin
 November 1993 Ärztliche Prüfung, Teilapprobation als Arzt im Praktikum
 Dezember 1995 Approbation als Arzt

Bisherige Anstellungen

1.1.–30.9.1994 Arzt im Praktikum bei Frau U. Bellabarba, niedergelassene Ärztin für Neurologie, Psychiatrie und Psychotherapie, Berlin
 1994–31.9.1996 Arzt im Praktikum und anschließend wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Dr. G. Henze, Abteilung Onkologie und Hämatologie, Kliniken und Polikliniken für Kinder- und Jugendmedizin, Virchow-Klinikum, Berlin
 Seit 1.10.1996 Weiterbildungs-Assistent, z.Zt. Neonatologie, in den Kliniken und Polikliniken für Kinder- und Jugendmedizin, Virchow-Klinikum, Berlin