

**СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ НА ПОВЪРХНОСТНИТЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА
КЛИНИЧНИ ПРОБИ ТРАХЕАЛНИ И ГАСТРАЛНИ АСПИРАТИ ОТ
НОВОРОДЕНИ ДЕЦА**

**Ася Цанова, Вишня Стоянова, Емилия Стоименова, Нели Жекова*,
Албена Йорданова**

*1407 София, ул. Козяк 1, Катедра „Химия и биохимия, физиология и патофизиология“
Медицински факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“
*1431, София, ул. Здраве 2, Университетска болница „Майчин дом“,
Медицински университет София
e-mail: albenagj@uni-sofia.bg*

Резюме:

Оптималният състав и повърхостни свойства на алвеоларният сърфактант (АС), покриващ алвеолите на въздушно-водната фазова граница, е от жизненоважно значение за осъществяване на дишането. Отклонения в състава и функцията на АС при недоносени новородени деца е водеща причина за възникването на Неонатален респираторен дистрес синдром (НРДС), чиято бърза диагностика е от решаващо значение за спасяването на рисковите новородени деца. В настоящата работа за първи път е направен сравнителен анализ на биофизични равновесни и динамични повърхостни характеристики на взети веднага след раждането клинични проби гастрални (ГА) и трахеални (ТА) аспирати от новородени деца с цел да се потвърди използването на ГА като адекватен модел за определяне на белодробна зрялост, с оглед последващо прилагане на животоспасяваща екзогенна сърфактант терапия.

Ключови думи: *трахеални аспирати, гастрални аспирати, белодробна зрялост, повърхостно напрежение*

**COMPARATIVE ANALYSIS OF CLINICAL SAMPLES SURFACE
CHARACTERISTICS OF NEWBORNS TRACHEAL AND GASTRIC ASPIRATES**

**Asya Tsanova, Vishnya Stoyanova, Emilia Stoimenova, Neli Jekova*,
Albena Jordanova**

*1407 Sofia, Koziak Str. 1, Department of Chemistry and Biochemistry, Physiology and
Pathophysiology, Faculty of Medicine, University of Sofia “St. Kliment Ohridski”
*1431, Zdrave Str. 2, University Maternity hospital Maichin dom, Medical University Sofia
e-mail: albenagj@uni-sofia.bg*

Abstract:

The optimal composition and surface properties of the alveolar surfactant (AS), that covers alveoli at the air-water interfase, is vital for breathing. Deviations in composition and function of AS in prematurely born infants is a leading cause of Neonatal Respiratory Distress Syndrome (NRDS), whose rapid diagnosis is critical to the rescue of the preterm risk infants. In the present study a comparative analysis of the biophysical equilibrium and dynamic surface characteristics of gastric (GA) and tracheal (TA) aspirates from newborns, taken immediately after birth, is made for the first time in order to confirm the use of GA as adequate model for diagnostics of lung maturity and the subsequent administration of life-saving exogenous surfactant therapy.

Keywords: *tracheal aspirates, gastric aspirates, pulmonary maturity, surface tension*

Въведение

Алвеоларният сърфактант (АС) в белия дроб е отговорен за понижаване на повърхостното напрежение на въздушно-водната фазова граница, предотвратяване на

алвеоларния колапс при издишване и осъществяване на оптималния газообмен (*Daniels, C. B., Orgeig, S., 2003; Лалчев З., Христова Е., 2010; Elena Lopez-R. et al., 2014*). АС е и първата бариера за патогените при навлизане в белият дроб, т.е. АС има изключително важна роля и в имунната защита (*Pérez-Gil J., 2008; Glasser J. R., Mallampalli R. K., 2012; Olmeda B., 2017*).

Алвеоларният сърфактант е хетерогенен комплекс, съдържащ 90% липиди и 10% протеини, който формира динамични стабилни моно- и мултислойни структури на граничната повърхност в алвеолите (*Olmeda B., 2017*). Четири белтъка, означени по реда на откриването им SP-A, SP-B, SP-C и SP-D, са специфични за АС. Специфичните сърфактантни протеини са от огромно значение за осъществяване на нормалните белодробни функции (*Haagsman HP, Veldhuizen EJ, 2000; Elena Lopez-R. et al., 2014*), но всъщност липидите са отговорни за достигане на ниски стойности на повърхностното напрежение при издишване. АС, изолиран от различни видове бозайници, показва консерватизъм в липидния състав: преобладават фосфолипидите, от които фосфатидилхолинът е основният компонент (72-80%), следван от фосфатидилглицерол (8-12%). Фосфолипиди, като фосфатидилсерин, фосфатидилетаноламин и сфингомиелин, които са главни компоненти на клетъчните мембрани, при АС се срещат в по-малки количества (*Parra, E. et al., 2015; Elena Lopez-R. et al., 2014; Lemke A. et al., 2017*). Специфична характеристика на сърфактантните фосфолипиди е, че включват необичайно висок процент двойнонаситени видове, които в голямата си част са дипалмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) - до 40% от фосфолипидите в АС, което е уникално високо съдържание, в сравнение с това при други биологични мембрани. Счита се, че ДПФХ е основният повърхностно активен компонент на АС. Той е представен в достатъчно количество, за да образува *in vivo* непрекъснат екстрацелуларен мономолекулен слой върху цялата алвеоларна повърхност в белия дроб. Отговорен е и за достигането на много ниски стойности на повърхностното напрежение при издишване. Чисти неразтворими монослоеве от ДПФХ, изследвани *in vitro*, могат да достигнат стойности на повърхностното напрежение близки до 0 mN/m при компресия на въздушно-водната фазова граница (*Clements J. A., 1957; 1977; Zuo Y.Y. & Possmayer F., 2007; Veldhuizen, E. J. & Haagsman H. P., 2000*).

Обемът на белите дробове непрекъснато се променя в процеса на дишане, което води и до непрекъснатата промяна на повърхностната площ, намираща се в контакт с въздуха. Връзката между повърхностното напрежение (γ), капилярното налягане (P) и радиусът на алвеолите (r) се подчиняват на закона на Лаплас:

$$P = 2\gamma/r,$$

според който повърхностното напрежение се увеличава с увеличаването на радиуса на алвеолите, и обратно (*Clements J. A., 1957; Akella A., et al., 2013*). АС претърпява циклични промени (в зависимост от неговия състав и структурна конформация), за да поддържа ниски стойности на повърхностно напрежение и да предотвратява алвеоларен колапс при издишване (*Creuwels L. A. et al. 1997; Elena Lopez-R. et al., 2014*).

Недостигът на АС и отклонения в оптималния му биохимичен състав водят до нарушения на респираторната дейност (*Лалчев З., Христова Е., 2010; El-Gendy N. et al., 2013; Gallacher D. J. et al., 2016*), най-сериозното от които е Неонаталният Респираторен Дистрес Синдром (НРДС) при недоносени новородени, на който се дължи в най-голяма степен високата смъртност при тези деца. Според статистиката до 2018 год., средно около 12-17% от ражданията завършват преждевременно, като само в България всяка година се раждат повече от 6000 недоносени деца. Инактивацията на АС, в резултат на навлизане на серумни белтъци в алвеоларния лумен, играе съществена роля при развитието на респираторни дисфункции и при възрастни (*Georgiev G. As. et al., 2012; El-*

Gendy N. et al., 2013). Способността на АС да намалява повърхностното напрежение на граничната повърхност води до намаляване на алвеоларната нестабилност, подобряване на кълмплайънса, увеличаване на алвеоларната площ за газообмен, увеличаване на стабилността на алвеоларно-капилярната мембрана (кръвно-газовата бариера), улеснява възстановяването на алвеолите, повишава защитните механизми на белия дроб, чрез фагоцитоза на бактерии, и др.

Традиционно белодробната зрялост на новородени деца се диагностицира чрез изследване на трахеални аспирати (ТА), взети след раждането. Известно е, че тази процедура е травмираща, инвазивна и не може да бъде унифицирана при пациентите, което значително затруднява анализа им. Ето защо се налага да се търсят нови бързи методи за диагностициране на белодробната зрялост при новородените, които да не са инвазивни и да изискват минимално количество от изследваните проби. Подходящи за целта са гастралните аспирати (ГА), които се вземат лесно и бързо непосредствено след раждането и са удобна моделна система за оценка на зрелостта на белия дроб при рискови новородени деца (с НРДС; след *in vitro* оплождане; родени от многоплодна бременност и др.).

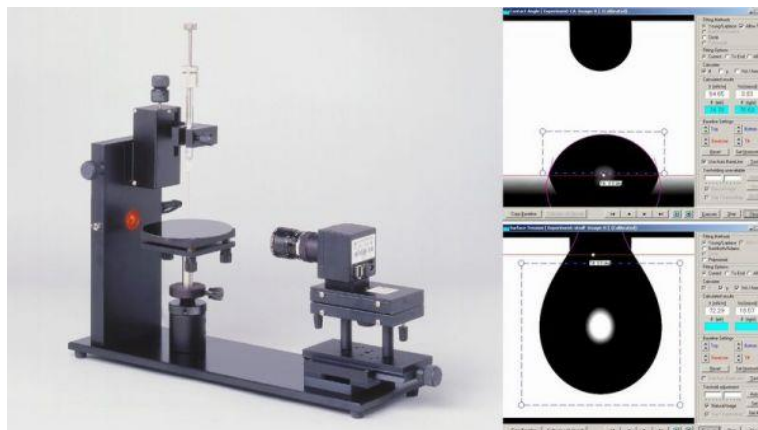
Целта на представеното изследване е за първи път да се направи сравнителен биофизичен и биохимичен анализ на проби трахеални и гастрални аспирати, взети от едни и същи недоносени новородени деца, за да се потърси корелация между повърхностните им характеристики. В допълнение е установено, че гастралните аспирати, които се получават с бърза, лесна и неинвазивна процедура веднага след раждането, могат да се използват като подходящи клинични проби за тестване чрез подходящи биофизични методи на белодробната зрялост на новородени деца.

Материали и методи

В настоящето изследване за анализиране на повърхностните параметри на АС са използвани клинични проби трахеални и гастрални аспирати от 10 недоносени новородени деца (на възраст от 26 до 32 гестационна седмица) с установени клинични признаци на НРДС, които впоследствие са третирани с екзогенен сурфактантен препарат. ГА са събрани веднага след раждане на новородените, чрез бърза и лесна процедура, при която се използва назогастрална сонда. Количеството на гастралните аспирати е около 1-2 ml, което позволява биофизичното и биохимичното им охарактеризиране чрез лабораторни методи, използващи минимални количества от изследваните проби. ТА са получени чрез промиване с малък обем (2ml) физиологичен разтвор на интубирани новородени с НРДС. Всяка проба е събрана след информирано родителско съгласие от Университетска болница „Майчин дом”, гр. София.

Измерване на равновесни и динамични повърхностни характеристики на клинични проби чрез осево-симетричен анализ на висяща капка

Методът на висящата капка позволява да се изследва повърхностното поведение на малки количества от тестваните клинични проби (50 μ l). Използван е тензиометър KSV CAM 101 (KSV Instruments Ltd., Finland, 2008, Germany, Фигура 1) за провеждане на експериментите с профилен анализ на висяща капка. След формиране на симетрична капка от пробата се изчаква 15 min, като това време е необходимо за адсорбция на повърхностно-активните молекули на въздушно-водната фазова граница и достигане на равновесна стойност на повърхностното напрежение $\gamma_{\text{equilibrium}}$ (γ_{eq} , mN/m). Чрез камера, свързана с апаратурата, се заснемат серия снимки с различна скорост (от 60 до 300 снимки в min) и по промяната на формата на капката, с помощта на вграден софтуер, се отчита равновесната стойност на повърхностното напрежение.



Фигура 1. Тензиометър KSV CAM 101 (KSV Instruments Ltd., Finland, 2008, Germany).

Посредством тази апаратура е възможно да бъдат измерени и динамичните повърхностни характеристики: максимална стойност на повърхностното напрежение на формираната капка при 100% площ (γ_{\max}), което съответства на стойностите на повърхностно напрежение при вдишване, а чрез свиване на капката да се намали площта ѝ до 20% от първоначалната площ, където се регистрира γ_{\min} (което съответства на повърхностното напрежение при издишване). Промяната на площта на капката се осъществява със специална апаратура, която променя обема ѝ чрез динамична компресия/декомпресия, аналогично на процесите вдишване и издишване.

Определяне на белтъчна концентрация в изследваните клинични проби по метода на Lowry с модификация на Peterson

За определяне на белтъчна концентрация на проби с високо съдържание на липиди се използва модификацията на метода на Лоури (*Lowry, O., et al., 1951*) - метод на Peterson (*Peterson, G. L., 1983*). Към 1ml от изследвата проба се прибавят 0,1 ml 0,15% натриев дезоксихолат, вортексира се и след 10 min се прибавя 0.1 ml 72% трихлороцетна киселина. Разбърква се добре и се изчаква 10 min. Центрофугира се 30 min (2000g), след което супернатантата се отдекантира, епруветките се обръщат върху филтърна хартия, а останалата течност се изсмуква с водна помпа. Към финната белтъчна утайка се добавя 1ml дестилирана вода и 1 ml от реактив А (СТС : 5% SDS : 0.8 M NaOH) в съотношение 1:2:1, разбърква се добре и се изчаква 10 min. Добавя се 0,5 ml реактив В (2N реактив на Folin:вода в съотношение 1:5) и се вортексира. Абсорбцията се измерва спектрофотометрично след 30 min при 750 nm.

Резултати и дискусия

За определяне на параметрити, характеризиращи повърхностното поведение на клиничните проби трахеални и гастрални аспирати е използван удобен съвременен метод - осево-симетричен анализ на висяща капка. Посредством този метод, който изисква изключително малък обем от изследваната проба, са определени както равновесните стойности, така и динамичните характеристики на повърхностното напрежение в изследваните проби. Това е направено чрез два тензиометрични експеримента – регистриране на промяната на повърхностното напрежение с времето до достигане на равновесна стойност (γ_{eq}), както и измерване на динамичните характеристики на повърхностно напрежение (γ_{\max} и γ_{\min}) в условия на компресия/декомпресия.

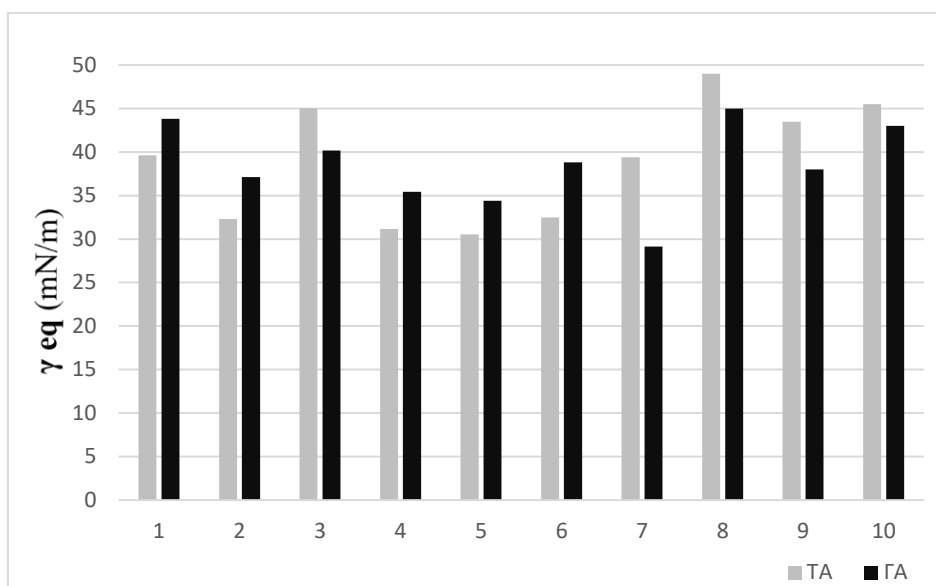
Максималното повърхностно напрежение (γ_{\max}) се регистрира в резултат на повърхностна реадсорбция на молекулите и преразпределение на филма в крайната фаза на декомпресия. Минималното повърхностно напрежение (γ_{\min}) се регистрира във финалната фаза на повърхностната компресия и зависи от максималната плътност на пакетиране на повърхностно активните компоненти.

В Таблица 1 и на Фигура 2 са показани стойностите на равновесното повърхностно напрежение, регистрирани при тестваните клинични проби.

Таблица 1. Стойности на повърхностните характеристики ($\gamma_{\text{equilibrium}}$, γ_{maximum} и γ_{minimum} , mN/m) на изследваните клинични проби трахеални (ТА) и гастрални (ГА) аспирати

бебе №	№ проба	$\gamma_{\text{equilibrium}}$ (mN/m)		γ_{maximum} (mN/m)		γ_{minimum} (mN/m)	
		ТА	ГА	ТА	ГА	ТА	ГА
41353	1	39,6	43,8	47,3	52,3	24,7	18,7
64841	2	32,3	37,1	53,3	44,1	23,9	19,7
64888	3	45,0	40,2	54,8	48,3	23,7	21,6
64922	4	31,2	35,4	52,7	43,8	21,4	18,4
41356	5	30,5	34,4	48,6	44,4	12,9	8,7
64840	6	32,5	38,8	50,3	45,3	23,0	16,0
41395	7	39,4	29,1	47,5	40,7	21,2	19,9
64924	8	49,0	45,2	59,0	53,3	19,3	18,3
64830	9	43,5	38,1	53,4	47,5	18,9	16,5
64840	10	45,5	43,0	53,4	50,8	20,3	23,2
Средни стойности		38,85	38,51	52,00	47,30	20,90	18,10

При трахеалните аспирати измерените стойности за γ_{eq} варират между границите от 30,5 mN/m до 49.0 mN/m, а при гастралните аспирати - между 29,1 mN/m и 45,2 mN/m. Анализът на резултатите показва, че различията при този параметър между ТА и съответстващата му проба ГА са незначителни (около 4 mN/m), с изключение на проба 7, при която $\Delta\gamma_{\text{eq}}=10,3$ mN/m (като по-високата стойност от 39,4 mN/m е регистрирана при трахеалния аспират).



Фигура 2. Равновесни стойности на повърхностното напрежение (γ_{eq}) в изследваните клинични проби

Допълнителен биохимичен анализ чрез метода на Lowry на общата белтъчна концентрация на 9 от тестваните 10-те двойки проби показва, че в тази проба концентрацията на белтък в ТА е значително по-ниска (891,43 $\mu\text{g/ml}$, Таблица 2) от определената концентрация в съответстващата ѝ проба ГА (2431,43 $\mu\text{g/ml}$, Таблица 2). Последният резултат най-вероятно се отнася и до понижена концентрация на специфичните сърфактантни белтъци в ТА на проби №7, които са от значение за формиране на стабилни моно- и мултислоеве на въздушно-водната фазова граница и поддържане на ниски стойности на повърхностното напрежение.

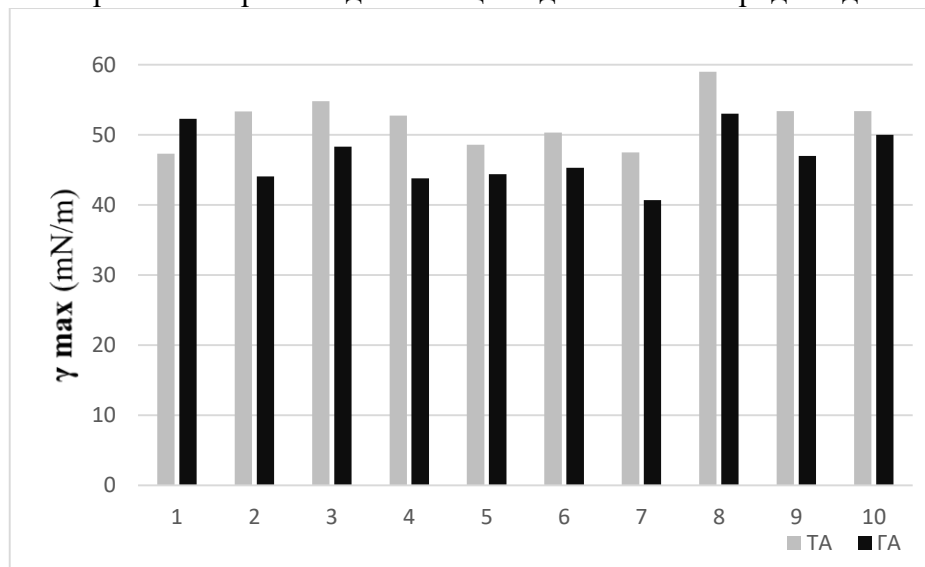
Средните стойности за двете тествани групи клинични проби показват, че се наблюдава отлична корелация между тях - съответно за ТА средната стойност за γ_{eq} е 38,85 mN/m, а за ГА - 38,51 mN/m. Предишни наши резултати показват, че тези усреднени стойности на равновесното повърхностно напрежение са аналогични на получените статистически достоверни резултати и за други анализирани проби ТА (Jordanova A. et al., 2010) и ГА (Bangyozova M. et al., 2013) от недоносени новородени.

Таблица 2. Обща белтъчна концентрация ($\mu\text{g/ml}$) в изследвани клинични проби ТА и ГА

бебе №	№ проба	белтък в ТА, $\mu\text{g/ml}$	белтък в ГА, $\mu\text{g/ml}$
41353	1	742,86	1672,86
64841	2	954,32	2065,71
64888	3	255,71	3042,86
64922	4	1582,86	2705,71
41356	5	2585,7	4177,14
41395	7	891,43	2431,43
64924	8	648,57	1734,62
64830	9	204,29	832,56
64840	10	1086,46	2142,86

Трябва да отбележим, че стойностите на равновесното повърхностно напрежение не са достатъчно информативен параметър за повърхностното поведение и нормалното функциониране на АС *in vivo*, тъй като дишането зависи от постоянните динамични промени в състава и в площта на формираните повърхностни структури. Ето защо от особен интерес в нашето изследване са динамичните повърхностни характеристики - максимална и минимална стойности на повърхностното напрежение (γ_{\max} и γ_{\min}), детектирани при условия на компресия и декомпресия на формираната висяща капка.

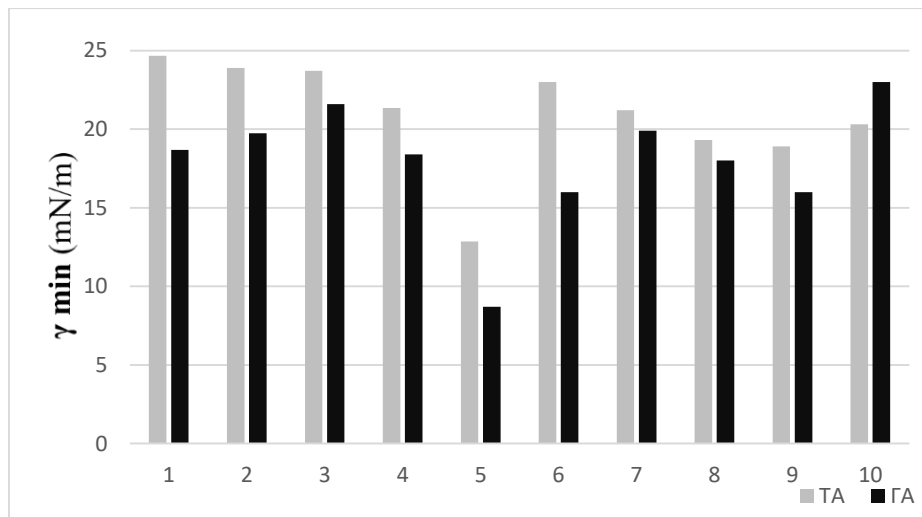
Стойностите на максималното повърхностно напрежение, регистрирани при анализа на трахеалните и съответстващите им гастрални аспирати, са показани в Таблица 1 и Фигура 2. При тестваните 10 ТА стойностите на γ_{\max} са съпоставими и се изменят в границите между 47,3 mN/m и 59,0 mN/m, а при ГА - между 40,7 mN/m и 53,3 mN/m. Сравнявайки пробите ТА и ГА взети от едно и също новородено недоносено дете се наблюдават отново аналогични различия в стойностите на γ_{\max} от около 5 до 9 mN/m, подобно на измерените стойности за γ_{eq} . Максималното повърхностно напрежение се регистрира в крайната фаза на декомпресия (съответстваща на максимално вдишване), която се характеризира с формиране на максимално „рехави“ монослоеове от повърхностно-активните компоненти, което зависи от скоростта на реадсорбция на потъналите при вдишване сърфактантни структури. При пробите от недоносени новородени недостатъчното количество на фосфолипиди и специфични сърфактантни протеини води до забавена реадсорбция при вдишване и повишени стойности на γ_{\max} , в сравнение с този показател при здрави новородени деца (*Bangyozova M. et al., 2013*). Усреднените стойности на този параметър за двете анализирани групи клинични проби е в отлично съответствие с наши предишни анализи, където са изследвани отделни групи ТА и ГА (*Lalchev Z. et al., 2004; Jordanova A. et al., 2010; Bangyozova M. et al., 2013*), за разлика от настоящият сравнителен анализ, при който са взети две различни проби трахеален и гастрален аспират от едно и също недоносено новородено дете.



Фигура 3. Максимални стойности на повърхностното напрежение (γ_{\max}) в изследваните клинични проби

Най-информативният параметър за оценка на белодробната зрялост се явява минималната стойност на повърхностно напрежение (γ_{\min}). Литературни данни показват, че в *in vivo* условия на динамична компресия на монослоеове АС достига много ниски стойности на γ_{\min} - под 5 mN/m и дори близки до 0 mN/m, което е от жизненоважно значение за поддържане на алвеоларна стабилност и предотвратяване на алвеоларен

колапс при издишване (Zuo Y.Y., Possmayer F., 2007). Нашите резултати по отношение на минималната стойност на повърхностно напрежение между трахеалните и гастралните аспирати показва съответствие и при този параметър (Таблица 1, Фигура 4). При ТА стойностите на γ_{\min} се колебаят в границите между 12,9 mN/m и 23,9 mN/m, а при ГА - между 8,7 mN/m и 23,2 mN/m. Сравнителният анализ на пробите ТА и ГА взети от едно и също новородено недоносено дете показва максимална разлика на γ_{\min} в проби №6 ($\Delta\gamma_{\min}=7,0$ mN/m), но дори и този резултат е в добро съответствие в рамките на статистическата грешка с получени предишни наши резултати (Lalchev Z. et al., 2004; Jordanova A. et al., 2010; Bangyozova M. et al., 2013). Прави впечатление измерените стойности на γ_{\min} при проби №5, които са значително по-ниски от измерения параметър в останалите проби, което вероятно се дължи на индивидуални особености в състава и поведението на компонентите на АС в тази проба. От направения биохимичен анализ се вижда, че белтъчната концентрация в проби №5 е най-висока, в сравнение с останалите клинични проби (2585,7 $\mu\text{g/ml}$ в ТА и 4177,1 $\mu\text{g/ml}$ в ГА, Таблица 2), което вероятно показва наличие на функционално активен сърфактант в това недоносено дете. В допълнение трябва да отбележим, че средните стойности на γ_{\min} са в отлична корелация помежду си, сравнявайки ТА с ГА - респективно 20,90 mN/m и 18,10 mN/m (Таблица 1)



Фигура 4. Минимални стойности на повърхностното напрежение (γ_{\min}) в изследваните клинични проби

Измерените стойности на γ_{\min} са по-високи при 9 от 10-те проби ТА, в сравнение с пробите ГА, което е очакван резултат, поради факта, че тези клинични проби се получават след вливане на затоплен физиологичен разтвор в белия дроб и последваща аспирация. Този използван до сега класически метод за диагностика на белодробната зрялост при новородени няма как да бъде унифициран при различните пациенти, защото зависи от начина на вземане на пробата и допълнителното разреждане на АС при тази процедура. За разлика от това пробите ГА се получават директно чрез назогастрална сонда и може да се приложи директен анализ без допълнително разреждане.

В заключение на проведеното от нас изследване можем да обобщим, че измерените повърхностни характеристики на тестваните гастрални аспирати съответстват на анализирания до сега и използвани в клиничната практика параметри, характерни за трахеалните аспирати. Резултатите от нашето изследване показват, че прилагането на бързия и удобен метод на висящата капка (измерването отнема едва 15-

20 минути) може да бъде успешно използван в клиничната практика като надеждна оценка на белодробната зрялост, чрез определяне на повърхностните характеристики на гастрални аспирати от новородени.

Благодарности: Изследванията са финансирани със средства от проект ДН 03/16 на Фонд Научни изследвания към Министерството на науката и образованието на Република България.

Автор за кореспонденция: доц. Албена Йорданова, PhD, Служебен адрес: гр. София 1407, ул. Козяк 1, Катедра Химия и биохимия, физиология и патофизиология, Медицински факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски“; GSM: 0887792772, e-mail: albenagj@uni-sofia.bg

Използвана литература:

1. Daniels C.B., Orgeig, S., Pulmonary surfactant: the key to the evolution of air breathing, *News Physiol Sci*, 18:151-157, 2003.
2. Лалчев З., Христова Е., Алвеоларен сърфактант и неонатален респираторен дистрес синдром – от белодробната физиология до съвременно високотехнологично лечение, Университетско издателство “Св. Климент Охридски”, София, 2010.
3. Lopez-Rodriguez E., Pérez-Gil J., Structure-function relationships in pulmonary surfactant membranes: From biophysics to therapy; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838:6, 1568–1585, 2014.
4. Pérez-Gil J. Structure of pulmonary surfactant membranes and films: the role of proteins and lipid–protein interactions; *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 1778, 1676–1695, 2008.
5. Glasser J. R., Mallampalli R. K., Surfactant and its role in the pathobiology of pulmonary infection, *Microbes Infect*, 14:1, 17-25, 2012.
6. Olmeda B., Martínez-Calle M., Pérez-Gil J., Pulmonary surfactant metabolism in the alveolar airspace: Biogenesis, extracellular conversions, recycling., *Annals of Anatomy* 209, 78–92, 2017.
7. Haagsman H.P., Veldhuizen E. J., Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics, *BBA* 1467:2, 255-270, 2000.
8. Parra E., Pérez-Gil J., Composition, structure and mechanical properties define performance of pulmonary surfactant membranes and films, *Chemistry and physics of lipids*, 185, 153-175, 2015.
9. Lemke A., Castillo-Sánchez J.C., Prodinger F., Ceranic A., Hennerbichler-Lugscheider S., Pérez-Gil J., Redl H. Wolbank S., Human amniotic membrane as newly identified source of amniotic fluid pulmonary surfactant, *Scientific Reports*, 7, 6406, 2017.
10. Clements J.A., Surface tension of lung extracts. *Proc Soc Exp Biol Med* 95: 170 –172, 1957.

10. Clements J.A., Functions of the alveolar lining. *Am Rev Respir Dis* 115: 67–71, 1977.
11. Zuo Y.Y., Possmayer F., How does pulmonary surfactant reduce surface tension to very low values? *J. Appl. Physiol.*, 102: 1733–1734, 2007.
12. Akella A., Shripad B Deshpande, Pulmonary surfactants and their role in pathophysiology of lung disorders, *Indian Journal of Experimental Biology*, 51, 5-22, 2013.
13. Creuwels L.A., van Golde L.M., Haagsman H.P., The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects, *Lung*, 175:1, 1-39, 1997.
14. El-Gendy N., Kaviratna A., Berkland C., Dhar P., Delivery and performance of surfactant replacement therapies to treat pulmonary disorders, *Therapeutic Delivery*, 4:8, 951-980, 2013.
15. Gallacher D.J., Hart K., Kotecha S., Common respiratory conditions of the newborn, *Breathe (Sheff)*, 12(1):30-42, 2016.
16. Georgiev G.A., Vassilieff C., Jordanova A., Tsanova A., Lalchev, Z., Foam film study of albumin inhibited lung surfactant preparations: effect of added hydrophilic polymers. *Soft Matter*, 8:12072-12079, 2012.
17. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R., Protein measurement with the Folin phenol reagent; *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
18. Peterson G. L., Determination of total protein. *Methods Enzymol.* 91, 95-121, 1983.
19. Jordanova A., Tsanova A., Doumanov J., Chakarov D., Georgiev G., Christova E., Vassilieff C., Lalchev Z., Effect of administration of surfactant therapy in newborns with neonatal respiratory distress syndrome, *Acta Medica Bulgarica*, 37:2, 32-39, 2010.
20. Bangyozova M., Jordanova A., Tsanova A., Jekova N., Chakarov D., Doumanov J., Christova E., Lalachev Z., Biochemical and Biophysical Investigation of Surfactant in Neonatal Gastric Aspirate at Birth. *Acta Med Port*, 26:1, 33-38, 2013.
21. Lalchev Z., Georgiev G., Jordanova A., Todorov R., Christova E., Vassilieff C.S., A comparative study of exogenous surfactant preparations and tracheal aspirate: interfacial tensiometry and properties of foam films, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 33:227–234, 2004.