

Agata PENCONEK, Arkadiusz MOSKAL

e-mail: a.penconek@ichip.pw.edu.pl

Katedra Inżynierii Procesów Zintegrowanych, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Wpływ zawartości mucyn w śluzie na dyfuzję agregatów sadzy

Wstęp

Niekompletne spalanie mieszanki paliwowej powoduje powstawanie fazy stałej spalin z silników zarówno o zapłonie samoczynnym, jak i iskrowym. Faza stała to cząstki sadzy o węglowym rdzeniu, na którym zaadsorbowane są liczne związki organiczne, głównie wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), oraz metaliczny pył, związki siarki, woda itd. Cząstki te łączą się ze sobą tworząc fraktalopodobne agregaty o rozbudowanym kształcie i wielkości w granicach 10÷10000 nm.

Spaliny z silnika diesla wykazują właściwości rakotwórcze, a obecność WWA na powierzchni agregatów sadzy, pozwala przypuszczać, że wyodrębniona ze spalin faza stała również odznaczać się będzie właściwościami kancerogennymi.

Agregaty sadzy obecne w powietrzu z każdym wdechem przedostają się do dróg oddechowych, tym intensywniej im częstsze i głębsze są nasze oddechy [Penconek i Moskal, 2013]. Podstawowym mechanizmem obronnym dróg oddechowych jest pokrycie całej ich powierzchni błoną śluzową. Gruczoły obecne w błonie śluzowej zbudowane są z urzęsionych komórek wydzielających śluz i płyn surowiczy. Usuwanie zdeponowanych w układzie oddechowym cząstek zachodzi dzięki rżeskom komórek migawkowych, które zginając się cyklicznie przesuwają śluz (wraz z zdeponowanymi cząstkami) w kierunku górnych dróg oddechowych. Komórka migawkowa (rżeskowa) wyposażona jest w blisko 200 rżesek o długości 6 μm .

Śluz, a w raz z nim zdeponowane cząstki, przemieszczają się wzdłuż dróg oddechowych z średnią prędkością 10÷100 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ [Cone, 2009]. Śluz produkowany jest przez pojedyncze komórki (komórki kubkowe) i wielokomórkowe gruczoły podśluzówkowe w ilości do 100 ml dziennie. W tchawicy człowieka naliczono blisko 7000 komórek kubkowych na mm^2 powierzchni [Jeffery i Li, 1997]. Liczba komórek kubkowych zmniejsza się wraz ze zmniejszaniem średnicy przekroju oskrzela. Śluz tworzy warstwę pokrywającą komórki rżeskowe o grubości 1÷20 μm (w zależności od obszaru dróg oddechowych). Od strony komórek rżeskowych śluz jest bardziej płynny, co umożliwia ruch rżesek, natomiast od strony światła przewodu oddechowego, jest bardziej gęsty, ułatwiając depozycję cząstek. Śluz w znakomitej większości składa się z wody (~95%), glikoprotein (głównie typu mucyny), lipidów (0,5÷5%), związków mineralnych (0,5÷1%) oraz białek (1%) [Khanvilkar i in., 2001].

Mucyny stanowią do 80% suchej masy śluzu. To łańcuchy o masie 10÷40 MDa i średnicy 3÷10 nm glikozyłowane w miejscu występowania proliny, treoniny i seryny [Lai i in., 2009].

W śluzie obecne są również łańcuchy DNA, stanowiące do 0,02% jego masy oraz liczne immunoglobuliny (IgF), stanowiące barierę ochroną przed bakteriami, wirusami, a także ułatwiające fagocytozę zatrzymanych patogenów przez makrofagi [Traczyk, 2003].

Dyfuzja cząstek przez warstwę śluzu zależy od jego składu, zawartości mucyn czy też pH. W literaturze brakuje jednak badań zajmujących się dyfuzją przez śluz cząstek o kształcie odbiegającym od sferycznego i właściwościach innych niż lecznicze. Dlatego celem niniejszych badań było pokazanie wpływu zawartości mucyn w śluzie na dyfuzję agregatów fraktalopodobnych pochodzących ze spalin z silnika Diesla.

Materiały i metody

Agregaty sadzy

W badaniach wykorzystano agregaty sadzy powstałe ze spalania w silniku Diesla komercyjnego paliwa o parametrach przedstawionych w tab. 1.

Tab. 1. Parametry paliwa wykorzystanego do wygenerowania agregatów sadzy

Liczba cetanowa, [-]	51
Gęstość w temperaturze 15°C, [$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$]	820÷845
Zawartość WWA, [%]	<7
Zawartość siarki, [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$]	<10
Temperatura zapłonu, [°C]	56

Paliwo spalane było w silniku Diesla pochodzącym z samochodu Mercedes, (1982 r., 4 cylindry, pojemność 2399 cm^3). Szczegółowy opis stanowiska badawczego do generowania spalin można odnaleźć w pracy Penconek i Moskal [2010].

Agregaty deponowane były na szklanych szalkach umieszczonych w specjalnie skonstruowanej komorze, podłączanej bezpośrednio do rury wydechowej silnika (komora była identyczna z używaną w pracy Penconek i in. [2013]). Charakterystykę agregatów wykorzystanych w badaniach zamieszczono w tab. 2. Średnią średnicę agregatu wyznaczono na podstawie rozkładu wielkości agregatów uzyskanego z wykorzystaniem spektrometru FAPES (Grimm, Niemcy). Pojemnościowy wymiar fraktalny wyznaczono na podstawie analizy zdjęć agregatów uzyskanych w skaningowym mikroskopie elektronowym. Natomiast stężenie WWA na powierzchni agregatów określono przy użyciu HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) Merck-Hitachi z detekcją fluorocencyjną FL prowadzoną w układzie faz odwróconych w kolumnie analitycznej. Analizę wykonano w zespole dr M. Szewczyńskiej (Centralny Instytut Ochrony Pracy, Warszawa).

Tab. 2. Charakterystyka agregatów sadzy

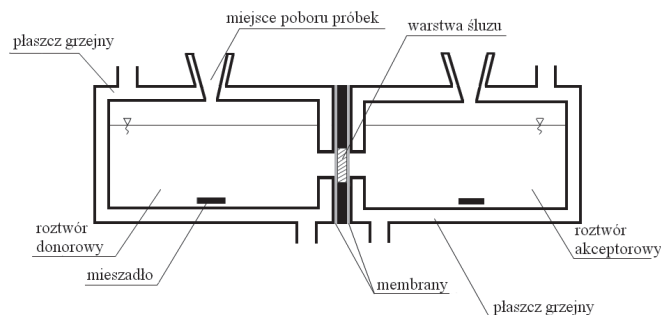
Średnia średnica, [nm]	117,3
Pojemnościowy wymiar fraktalny, [-]	1,63
WWA na powierzchni, [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	153,3

Zdeponowane na szalkach agregaty poddawano następnie procedurze przygotowania polegającej na inkubacji w roztworze 1:1 20% KOH (Chempur, Polska) i 96% EtOH przez 48 godzin. Po tym czasie oddzielano agregaty sadzy od roztworu wirując zawiesinę przez 30 min przy 6000 obr·min⁻¹ (MPW-56, Polska). Supernatant zlewano, a zawieszony w wodzie agregaty poddawano sonikacji w myjce ultradźwiękowej (Polsonic typ Sonic 14, Polska) przez 3 minuty.

Tak przygotowaną zawiesinę agregatów o znanym stężeniu umieszczano po stronie donorowej celki do pomiaru dyfuzji. Po stronie akceptorowej celki umieszczano wodę.

Celka do badania dyfuzji

Celka pomiarowa wykorzystana w badaniach była taka sama jak w pracy Penconek i in. [2013]. Pomiędzy częścią donorową a akceptorową celki umieszczano membrany (średnica odcięcia 100 nm, DURAPORE, MILLIPORE, Irlandia) oraz warstwę śluzu o określonej zawartości mucyn. Schemat celki pomiarowej przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Celka do badania dyfuzji

Warstwa śluzu

Naturalny śluz ma zmienny skład oraz jest trudny do pozyskania, dlatego w badaniach wykorzystano posłużono się sztucznym śluzem. Uproszczony skład śluzu użytego w badaniach: mucyna typu II (*Sigma Aldrich*, USA), azydek sodu (0,002%) (*POCh*, Polska) rozpuszczone w buforze HEPES 99%/ACROS (*POCh*, Polska), *pH* 7,4. W badaniach użyto śluzu o czterech różnych masowych stężeniach mucyn: 2, 8, 15, i 20% masowych.

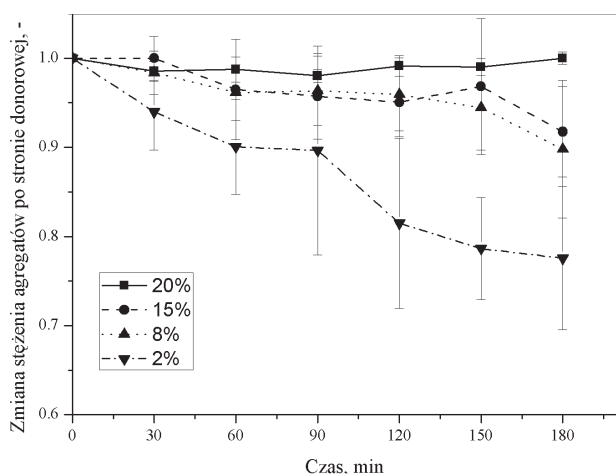
Pomiar dyfuzji agregatów sadzy przez warstwę śluzu

Pomiar dyfuzji agregatów sadzy przez warstwę śluzu opierał się na metodzie zaproponowanej przez *Rudd i Stroma [1981]* i z powodzeniem wykorzystanej we wcześniejszej pracy *Penconek i in. [2013]*.

Analizy dokonano spektrofotometrycznie przy długości fali 750 nm względem wody jako próby odniesienia.

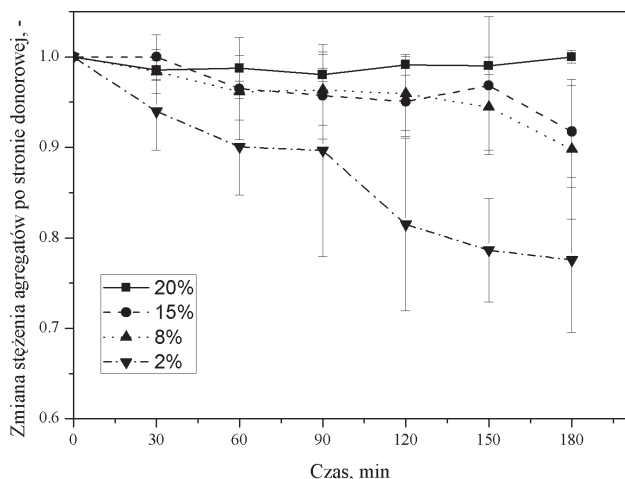
Wyniki i dyskusja

Uzyskane wyniki zmiany stężenia agregatów sadzy po stronie donorowej przedstawiono w postaci stosunku wartości stężenia w danej chwili czasu do stężenia początkowego ($C_0 = 0,06 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) po stronie donorowej i zestawiono na rys. 2 dla różnych wartości stężeń mucyn w warstwie śluzu (2, 8, 15, 20% mas.).



Rys. 2. Zmiana stężenia agregatów DEP po stronie donorowej dla stężenia 2, 8, 15, 20% mas. mucyn w śluzie

Na rys. 3 zaprezentowano stężenie agregatów po stronie akceptorowej celki dyfuzyjnej wyrażone w $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dla czterech badanych stężeń mucyn w śluzie. Wyniki zaprezentowane na rys. 2 i 3 są uśrednionymi wynikami z 4-8 pomiarów, a słupki błędów odpowiadają odchyleniom standardowym.



Rys. 3. Stężenie agregatów po stronie akceptorowej dla stężenia 2, 8, 15, 20% mas. mucyn w śluzie

Uzyskane wyniki pokazują, że wzrost zawartości mucyn w śluzie do 20% mas. zmniejsza szybkość dyfuzji agregatów sadzy głównie przez hamowanie wnikania agregatów do warstwy śluzu.

W przypadku 20% mas. zawartości mucyn w śluzie stężenie agregatów po stronie donorowej (z uwzględnieniem odchylenia standardowego) jest średnio stałe w czasie.

Natomiast w przypadku 2% mas. zawartości mucyn w śluzie wnikanie agregatów sadzy do warstwy śluzu jest najintensywniejsze.

Analizując zmianę stężenia agregatów po stronie akceptorowej (Rys. 3) zauważyć można, że dla zawartości mucyn do 15% masa agregatów dyfundujących przez śluz w czasie jest podobna (uwzględniając odchylenia standardowe) i wyższa od masy agregatów dyfundujących przez śluz zawierający 20% mucyn.

Zwiększenie szybkości dyfuzji cząstek przy zmniejszeniu stężenia mucyn w śluzie obserwowane jest również w literaturze np. dla cząstek glikolu polietylenowego [*Lieleg i in., 2010*].

Wzrost stężenia mucyn w śluzie powyżej 20% mas. zwiększa jego usieciowanie na tyle, że spowalnia dyfuzję agregatów. Jednocześnie obserwuje się tzw. lag-fazę (do 60 min), fazę zatrzymania dyfuzji, zaobserwowaną już w literaturze w przypadku dyfuzji cząstek przez śluz o *pH* mniejszym niż 4, który charakteryzuje się większym stopniem usieciowania, niż śluz o *pH* w zakresie 6-8 [*Shaw i in., 2005*].

Wnioski

Przeprowadzone badania pokazały, że również w przypadku dyfuzji przez śluz struktur o kształcie niekulistym, a rozgałęzionym dendrytycznym, do jakich należą użyte w badaniach agregaty sadzy, obserwuje się efekt spowolnienia dyfuzji przy wzroście zawartości mucyn w śluzie do 20% masowych oraz częściową akumulację agregatów wewnątrz śluzu.

LITERATURA

- Cone R.A., 2009. Barrier properties of mucus. *Adv. Drug Del. Rev.*, **61**, 75-85. DOI: 10.1016/j.addr.2008.09.008
- Jeffery P.K., Li D., 1997. Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. *Eur. Respir. J.*, **10**, 1655-1662. DOI: 10.1183/09031936.97.10071655
- Khanvilkar K., Donovan M.D., Flangan D.R., 2001. Drug transfer through mucus. *Adv. Drug Del. Rev.*, **48**, 173-193. DOI: 10.1016/S0169-409X(01)00115-6
- Lai S.K., Wang Y.Y., Wirtz D., Hanes J., 2009. Micro- and macrorheology of mucus. *Adv. Drug Del. Rev.*, **61**, 86-100. DOI: 10.1016/j.addr.2008.09.012
- Lieleg O., Vladescu I., Ribbeck K., 2010. Characterization of particle translocation through mucin hydrogels. *Biophys. J.*, **98**, 1782-1789. DOI: 10.1016/j.bpj.2010.01.012.
- Penconek A., Moskal A., 2010. Budowa stanowiska do generowania i analizy spalin z wysokoprężnego silnika *Diesla*. *Inż. Ap. Chem.*, **49**, 1, 83-84
- Penconek A., Moskal A., 2013. Deposition of diesel exhaust particles from various fuels in a cast of human respiratory system under two breathing patterns. *J. Aerosol Sci.*, **63**, 48-59. DOI: 10.1016/j.jaerosci.2013.04.008
- Penconek A., Lasota M., Moskal A., 2013. Badanie dyfuzji agregatów sadzy (DEP) w warstwie śluzu. *Inż. Ap. Chem.*, **52**, 6, 550-552
- Rudd C.J., Strom K.A., 1981. A spectrophotometric method for the quantitation of diesel exhaust particles in guinea pig lung. *J. Appl. Toxicol.*, **1**, 83-86. DOI: 10.1002/jat.2550010207
- Shaw L.R., Irwin W.J., Grattan T.J., Conway B.R., 2005. The influence of excipients on the diffusion of ibuprofen and paracetamol in gastric mucus. *Int. J. Pharm.*, **290**, 145-154. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2004.11.028
- Traczyk W. Z., 2003. *Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa

Praca została sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2012/05/N-ST8/03018.