

Katarzyna Dobrowolska, Katarzyna Szamer, Tomasz R. Sosnowski

e-mail: katarzyna.dobrowolska.dokt@pw.edu.pl

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

## Badania właściwości reologicznych sztucznego śluzu oskrzelowego i ich wpływu na transport masy w układzie oddechowym

### Wstęp

Problem zanieczyszczenia powietrza jest wciąż aktualny mimo intensywnych działań na rzecz ochrony środowiska oraz zdrowia. Istotnym zagadnieniem w tym obszarze jest przeciwdziałanie przyczynom i skutkom zanieczyszczeń antropogenicznych możliwe dzięki ocenie wpływu wdychanych pyłów na układ oddechowy, w tym – na płyny biologiczne płuc.

Śluz oskrzelowy jest przykładem hydrożelowego płynu biologicznego, stanowiącym naturalną barierę zabezpieczającą nabłonek oskrzeli przed działaniem wdychanych zanieczyszczeń powietrza [Samet i in. 1994]. Stanowi mieszaninę wieloskładnikową, w składzie której można wyróżnić glikoproteiny – mucyny, mające największy wpływ na właściwości reologiczne, kwas deoksyrybonukleinowy, proteiny, tłuszcze oraz sole mineralne [Shogren i in., 1989]. Naturalny śluz oskrzelowy posiada specyficzne właściwości reologiczne i jest przykładem naturalnego płynu nienewtonowskiego, wykazującego właściwości tiksotropowe, które determinują jego rolę w układzie oddechowym [Cone i in., 1999].

W wyniku inhalacji pyłów, do głębszych struktur oddechowych docierają głównie aerozole cząstki drobne (frakcja PM<sub>2.5</sub>, obecna m.in. w smogu atmosferycznym), w tym także nanometryczne i nanostrukturalne, które charakteryzują się bardzo wysokim rozwinięciem powierzchni. Złożone reologiczne właściwości warstwy cieczy pokrywającej oskrzela silnie ograniczają penetrację osadzonych pyłów do komórek nabłonka, jednak na efektywność tego transportu duży wpływ mają oddziaływania o charakterze powierzchniowym między osadzonymi cząstkami a składnikami śluzu [Odziomek i in. 2015; Odziomek i in. 2017].

Przedstawione w niniejszej pracy badania miały na celu określenie właściwości reologicznych sztucznego (modelowego) śluzu oskrzelowego (MSO) oraz ocenę ich zmian w obecności wybranych cząstek nanostrukturalnych w kontekście wpływu tych cząstek na transport masy w układzie oddechowym.

### Badania doświadczalne

#### Materiały

W pomiarach zastosowano nanostrukturalne cząstki stałe pozyskane ze spalin silnika Diesla zasilanego dwoma rodzajami paliw (EcoDiesel i Verva ON [Penconek i in., 2013]), a także nanometryczne cząstki tlenku ceru (IV), które mogą występować w spalinach stanowiąc domieszki do olejów napędowych [Skillas i in. 2000; Zhang i in. 2013].

W badaniach stosowano dwuskładnikowy model, zawierający mucyny oraz czynnik konserwujący – azydek sodu (NaN<sub>3</sub>) MSO [Odziomek i in. 2012]. Mucyny (typ II; M2378; Sigma-Aldrich) poddano procesowi częściowego oczyszczenia na podstawie metody Glenistera [Glenister i in., 1988]. Mucyny (10% w/w) wprowadzone do 0,1 M roztworze NaCl o pH 7 mieszano przez ok. 12 h za pomocą mieszadła magnetycznego (300 rpm), a następnie wirowano (10 000 obr/min) przez 10 minut. Do otrzymanego supernatantu dodano etanol, tak aby otrzymać stężenie objętościowe mieszaniny równe 60%. Wytrącony osad rozpuszczano przez ok. 12 h w 0,1 M roztworze NaCl (po rozpuszczeniu ponownie doprowadzono pH do 7). Całą procedurę powtórzono dwukrotnie. Końcowy osad poddano liofilizacji, a otrzymany proszek przechowywano w temp. 5°C.

#### Metodyka.

Charakterystykę reologiczną śluzu przeprowadzono dla 5% wodnego

roztworu mucyn o pH 7,4, co odpowiada fizjologicznemu odczynowi i stężeniu naturalnego śluzu oskrzelowego w stanie niepatologicznym [Lai i in., 2009]. Roztwór otrzymano poprzez rozpuszczenie mucyn (5% w/w) oraz NaN<sub>3</sub> (0,01% w/w) w wodzie ultraczystej (system Direct Q 3 UV, Merck) Próbki rozpuszczano, w trakcie łagodnego mieszania (150 rpm) w stałej temperaturze (ok. 30°C) przez ok. 20 h. Oprócz pomiaru właściwości reologicznych MSO oceniano również ich zmiany w obecności nanostruktur tj. cząstek stałych Diesla (z paliw EcoDiesel i Verva ON) oraz tlenku ceru (IV) (Sigma-Aldrich).

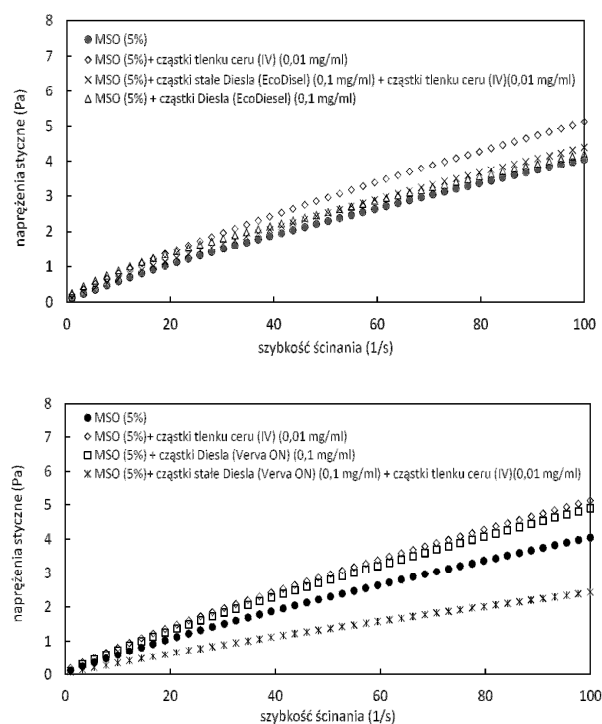
#### Aparatura

Pomiary właściwości reologicznych MSO wykonano za pomocą reometru oscylacyjnego MCR-102 (Anton Paar, Austria) w układzie płytka-płytko. Badania prowadzono w układzie termostatowanym w temperaturze fizjologicznej (36,6°C ± 0,1°C).

### Wyniki i dyskusja

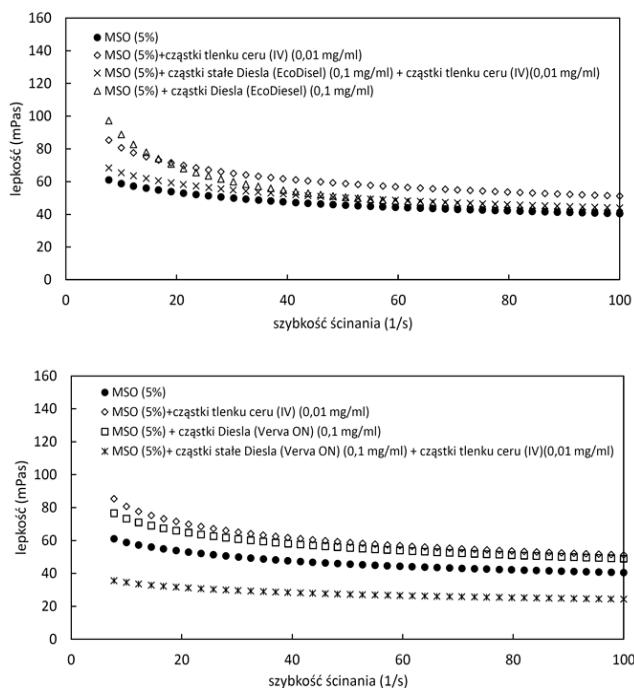
Na rys. 1 i 2 przedstawiono kolejno krzywe płynięcia  $\tau(\dot{\gamma})$  oraz zależności lepkości od szybkości ścinania,  $\mu(\dot{\gamma})$ .

Otrzymane krzywe płynięcia potwierdzają, że czysty 5% modelowy płyn MSO wykazuje własności płynu nienewtonowskiego rozrzedzanego ścinaniem (pseudoplastycznego), bez granicy płynięcia. W obecności cząstek nanostrukturalnych płyn nie zmienia swojego charakteru, natomiast widocznej zmianie ulega przebieg krzywych płynięcia. Zarówno obecność cząstek tlenku ceru (IV) jak i cząstek stałych Diesla (z obu paliw) wpływa na wzrost naprężeń stycznych przy danej szybkości ścinania w porównaniu z czystym MSO. W obecności obu



Rys. 1. Krzywe płynięcia  $\tau(\dot{\gamma})$  modelowego śluzu oskrzelowego (MSO) – czystego oraz w obecności wybranych cząstek nanostrukturalnych

rodzajów cząstek ( $\text{CeO}_2$  i spalin *Diesla*) zaobserwowano, że cząstki z paliwa *Verva ON* powodują obniżenie, zaś cząstki z paliwa *EcoDiesel* – wzrost wartości naprężeń stycznych w stosunku do czystego MSO. Jednocześnie są to wartości pośrednie między zmierzonymi dla dodatku samych nanocząstek  $\text{CeO}_2$  czy cząstek dieslowskich. Obserwowane efekty zależą także od stężenia cząstek. Obecność cząstek tlenku ceru (IV) oraz cząstek stałych *Diesla* w sieci mucyn powoduje zatem, zwłaszcza przy niższych szybkościach ścinania (zakres  $5 \div 40 \text{ s}^{-1}$ ), wzrost lepkości MSO, co pokazują zależności na rys.2. Świadczy to o oddziaływaniu badanych cząstek ze strukturą MSO, jednak bez niszczenia specyficznych wiązań pomiędzy molekułami mucyn, tj. mostków disiarczkowych, czy wiązań niekowalencyjnych w łańcuchach oligosacharydowych [King, 2005].



Rys. 2. Krzywe lepkości  $\mu(\dot{\gamma})$  modelowego śluzu oskrzelowego (MSO) – czystego oraz w obecności badanych cząstek nanostrukturalnych

Na rys. 2 uwidocznił się również synergiczny efekt oddziaływania cząstek stałych *Diesla* (0,1 mg/ml) oraz nanocząstek tlenku ceru (IV) (0,01 mg/ml) na MSO. Dla obu typów cząstek dieslowskich z domieszką nanocząstek  $\text{CeO}_2$  zauważono obniżenie wartości lepkości, w stosunku do efektu wywołanego obecnością samych cząstek spalin *Diesla* albo samych cząstek tlenku ceru (IV).

W przypadku cząstek z paliwa *EcoDiesel* i dodatku  $\text{CeO}_2$  zaobserwowano niewielki efekt zwiększenia lepkości, zauważalny zwłaszcza dla mniejszych szybkości ścinania (zakres  $5 \div 30 \text{ s}^{-1}$ ).

Natomiast w obecności cząstek drugiego typu (*Verva ON*) i  $\text{CeO}_2$  zauważono istotne obniżenie lepkości zarówno w stosunku do czystego MSO jak i MSO z dodatkiem cząstek spalin. Taki efekt może być spowodowany rozluźnieniem struktury MSO na skutek większej penetracji cząstek egzogennych w głąb śluzu.

Przeprowadzone badania wykazały, że badane cząstki *Diesla* w stężeniu 0,1 mg/ml w MSO zmieniają właściwości reologiczne MSO, co odbywa się w sposób specyficzny dla każdego typu cząstek. Takie efekty mogą się wiązać m.in. z różną wielkością powierzchni właściwej oraz organizacją przestrzenną badanych cząstek nanostrukturalnych [Penconek i in., 2013].

## Wnioski

W pracy zaprezentowano wyniki badań podstawowych właściwości reologicznych modelowego śluzu oskrzelowego, umożliwiającą ocenę wpływu wybranych cząstek pochodzenia egzogenego na strukturę MSO.

Stwierdzono, że obecność poszczególnych cząstek nanostrukturalnych w sposób specyficzny i zależny od stężenia zaburza właściwości reologiczne śluzu powodując zmniejszenie lub zwiększenie wzajemnych oddziaływań między elementami strukturalnymi tego płynu. Wyraża się to m.in. poprzez zmiany lepkości pozornej MSO w danych warunkach przepływu ścinającego.

Wyniki sugerują, że wdychane cząstki nanostrukturalne osadzające się w płynie biologicznym układu oddechowego mogą w znaczący sposób wpływać na procesy transportu masy w drzewie oskrzelowym, m.in. upośledzając mechanizm śluzowo-rzęskowy oczyszczania oskrzeli lub zaburzając szybkość dyfuzji wewnątrz śluzu, co ma istotne znaczenie m.in. w procesie dostarczania leków drogą inhalacyjną

## LITERATURA

- Cone R. (1999). *Mucus* [In:] Ogra P., Mestercky J., Lamm M., Strober W., Bienenstock J., McGhee J. (Eds.), *Mucosal Immunology*, Academic Press, San Diego.
- Glenister D., Salamon K., Smith K., Beighton D., Keevil C., (1988). Enhanced growth of complex communities of dental plaque bacteria in mucin-limited continuous culture. *Microb. Ecol. Health Dis.*, 1, 31-38. DOI: 10.3109/08910608809140176
- King M. (2005). *Mucus and its role in airway clearance and cytoprotection*. [In:] Quatayba H., Shannon J., Martin J. (Eds.) *Physiologic basis of respiratory disease*, Hamilton, BC Decker Inc.
- Lai S. K., Wang Y. Y., Hanes J., (2009). Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 158–171. DOI: 10.1016/j.addr.2008.11.002
- Odziomek M., Kalinowska M., Pluzińska, A., Rozeń A., Sosnowski T.R., (2017). Bronchial mucus as a complex fluid: molecular interactions and influence of nanostructured particles on rheological and transport properties. *Chem. Proc. Eng.* 38, 217-229. DOI: 10.1515/cpe-2017-0017
- Odziomek M., Sosnowski T.R., Gradoń L., (2015). The influence of Functional Carrier Particles (FCPs) on the molecular transport rate through the reconstructed bronchial mucus - in vitro studies. *Transp. Porous Media* 106, 439-454. DOI: 10.1007/s11242-014-0409-1
- Odziomek M. Sosnowski T. R., Gradoń L., (2012) Conception, preparation and properties of functional carrier particles for pulmonary drug delivery. *Int. J. Pharm.* 433, 51 – 59. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.04.067
- Penconek A., Drażyk A., Moskal A., (2013) Penetration of Diesel exhaust particles through commercially available dust half masks, *Ann. Occup. Hyg.* 57, 360-373. DOI: 10.1093/annhyg/mes074
- Samet J., Cheng P., (1994). The role of airway mucus in pulmonary toxicology. *Environ. Health Perspect.* 102 Suppl. 2, 89-103
- Shogren R., Gerken T. A., Jentoft N., (1989). Role of glycosylation on the conformation and chain dimensions of O-linked glycoproteins: light-scattering studies of ovine submaxillary mucin. *Biochemistry*, 28, 5525-5536
- Skillas, G., Qian, Z., Baltensperger, U., Matter, U., Burtscher, H. (2000). The influence of additives on the size distribution and composition of particles produced by diesel engines. *Combust. Sci. Technol.* 154, 259–273. DOI: 10.1080/00102200008947279
- Zhang, J., Nazarenko, Y., Zhang, L., Calderon, L., Lee, K. B., Garfunkel, E., Schwander, S., Tetley, T. D., Chung, K. F., Porter, A. E., (2013). Impacts of a nanosized ceria additive on diesel engine emissions of particulate and gaseous pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 47, 13077-13085. DOI: 10.1021/es402140u

*Praca realizowana w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu nr 2014/13/B/ST8/00808. Autorzy dziękują dr inż. Dorocie Kondej oraz dr inż. Agacie Penconek za udostępnienie próbek nanomateriałów.*