

Metoda badania wpływu nanocząstek na dynamiczne napięcie powierzchniowe modelowego surfaktantu płucnego w układzie pulsującego pęcherzyka¹

*mgr inż. DOROTA KONDEJ¹
dr hab. inż. TOMASZ R. SOSNOWSKI, prof. nadzw. PW²*

*¹ Centralny Instytut Ochrony Pracy –
Państwowy Instytut Badawczy
00-701 Warszawa*

*ul. Czerniakowska 16
² Politechnika Warszawska
00-645 Warszawa
ul. Waryńskiego 1*

Słowa kluczowe: nanocząstki, surfaktant płucny, napięcie powierzchniowe, pulsujący pęcherzyk.

Keywords: nanoparticles, pulmonary surfactant, surface tension, pulsating bubble.

Streszczenie

Metodę stosuje się do badania wpływu cząstek nanoproszków występujących na stanowiskach pracy na napięcie powierzchniowe modelowego surfaktantu płucnego.

Badania polegają na wyznaczeniu zmian napięcia powierzchniowego podczas oscylacji pęcherzyka powietrznego wytworzonego w roztworze mode-

lowego surfaktantu płucnego.

Ocenę wpływu nanocząstek na aktywność powierzchniową surfaktantu płucnego przeprowadza się na podstawie analizy kryteriów ilościowych opisujących pętle histerezy napięcia powierzchniowego w funkcji zredukowanej powierzchni międzyfazowej.

Summary

This method is used to study the influence of particles of nanopowders on the surface tension of a model pulmonary surfactant. The study consists in determining the changes in surface tension during the oscillation of the air bubble formed in the solution of the model pulmonary surfactant.

The assessment of the impact of nanoparticles on the surface activity of the pulmonary surfactant is carried out on the basis of quantitative criteria describing the hysteresis loops of surface tension as a function of the reduced interfacial area.

¹ Publikacja przygotowana na podstawie wyników projektu nr I.B.10. uzyskanych w ramach II etapu programu wieloletniego p.n. „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy” dofinansowywanego w latach 2011-2013 w zakresie badań naukowych i prac rozwojowych ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

UWAGI WSTĘPNE

Pojęciem surfaktantu płucnego określa się zespół związków powierzchniowo czynnych występujących naturalnie na powierzchni ciekłej wyściółki końcowych części układu oddechowego. Surfaktantowi płucnemu przypisuje się pełnienie istotnych funkcji fizjologicznych i obronnych ważnych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Najważniejszymi funkcjami fizjologicznymi surfaktantu płucnego są (Halliday 2008; Lewis 2006; Gradoń, Podgórski 1989):

- obniżenie napięcia powierzchniowego w pęcherzykach płucnych, co zapobiega ich zapadaniu się w końcowej fazie wydechu
- zwiększenie stabilności pęcherzyków płucnych
- zapobieganie obrzękowi płuc.

Surfaktant pełni również funkcje obronne, do których należy zaliczyć:

- samooczyszczanie pęcherzyków płucnych z zanieczyszczeń aerozolowych dzięki przepływowi cieczy z zaadsorbowanymi na ich powierzchni cząsteczkami surfaktantu wskutek efektów Marangoniego
- działalność bakteriobójczą polegającą na bezpośrednim oddziaływaniu przez apoproteiny SP-A na makrofagi zbliżające się do światła pęcherzyka bez udziału komórek litycznych.

Podstawowym zadaniem surfaktantu płucnego jest regulacja napięcia powierzchniowego w warunkach dynamicznych wywołanych oddychaniem (cykliczną zmianą powierzchni ciec-zgaz pokrywającej nabłonek pęcherzyków płucnych). Zdolność ta jest nazywana aktywnością powierzchniowo czynną surfaktantu płucnego. Dla układu surfaktantu płucnego charakterystyczne jest występowanie znacznego spadku napięcia powierzchniowego podczas kompresji powierzchni ciec-zgaz (wydech) oraz występowanie histerezy napięcia powierzchniowego w funkcji pola powierzchni

międzyfazowej w cyklu ekspansja-kompresja (wdech-wydech), (Notter i in. 1982).

Pod wpływem czynników zewnętrznych, np. depozycji cząstek na powierzchni pęcherzyka płucnego, może nastąpić zmiana aktywności powierzchniowej surfaktantu płucnego. Odzwierciedleniem tego faktu jest zmiana kształtu pętli histerezy napięcia powierzchniowego w cyklu kompresja-ekspansja (tzn. cyklu wydech-wdech) i zmiana wartości kryteriów ilościowych ją opisujących (Kondej, Sosnowski 2010). Zaburzenie aktywności powierzchniowej surfaktantu prowadzi więc do zaburzenia jego funkcji.

Jedną z podstawowych metod pomiaru dynamicznego napięcia powierzchniowego jest metoda pulsującego pęcherzyka. Polega ona na wytworzeniu drobnego pęcherzyka powietrznego na końcu kapilary zanurzonej w badanym surfaktancie. Tłoczek pulsatora powoduje pulsowanie hydrauliczne cieczy. Zmiany ciśnienia zachodzące w trakcie wymuszonych pulsacji pęcherzyka są rejestrowane przez układ zawierający przetwornik ciśnienia. Pomiar podciśnienia w cieczy otaczającej pęcherzyk podwieszony do ujścia kapilary otwartej do atmosfery pozwala na określenie chwilowego napięcia powierzchniowego σ , zgodnie z równaniem Younga-Laplace'a:

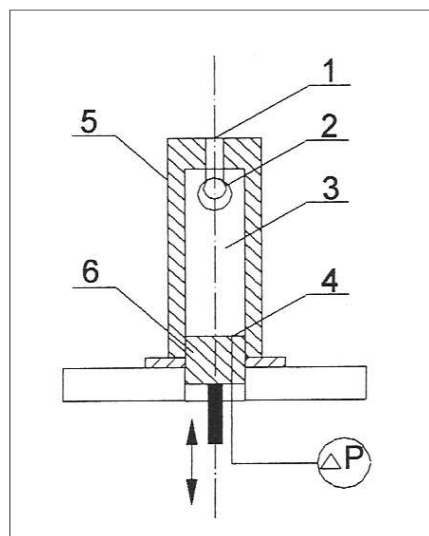
$$\sigma = \frac{r\Delta P}{2},$$

gdzie:

r – promień pęcherzyka,

ΔP – różnica ciśnień między ciśnieniem atmosferycznym i ciśnieniem wewnątrz pęcherzyka.

Na rysunku 1. przedstawiono schemat ideowy tensjometru z pulsującym pęcherzykiem (PBS).



Rys. 1. Schemat i zasada działania tensjometru z pulsującym pęcherzykiem (PBS): 1 – kapilara otwarta do atmosfery, 2 – pęcherzyk powietrza, 3 – badany surfaktant, 4 – przetwornik ciśnienia, 5 – naczynko pomiarowe, 6 – tłoczek pulsatora.

Zasada działania przyrządu oraz jego budowa zapewnia podobieństwo procesów przebiegających w tensjometrze oraz pęcherzyku płucnym podczas cyklu oddechowego. Komora pomiarowa tensjometru jest wypełniona substancją powierzchniowo czynną o własnościach zbliżonych do naturalnego surfaktantu płucnego. Wewnątrz komory znajduje się cienka kapilara, na której końcu zostaje wytworzony pęcherzyk powietrza. Całość jest umieszczona w komorze termostatującej w temperaturze zbliżonej do temperatury ciała człowieka (około 37 °C).

Kapilara w pewnym sensie imituje oskrzelik oddechowy, natomiast pęcherzyk powietrzny – pęcherzyk płucny. Oscylacje wielkości pęcherzyka przebiegają w zakresie od 0,55 mm (maksymalny promień) do 0,4 mm (minimalny promień pęcherzyka), który odpowiada stopniowi kompresji w pęcherzyku płucnym. Zakres zmienności tempa pulsacji pęcherzyka powietrznego w PBS (od 1 do 100 cykli/min) umożliwia ponadto przeprowadzanie badań z pulsacją zbliżoną do częstości oddechowej człowieka.

PROCEDURA BADAWCZA

1. Zakres metody

Metodę podaną w niniejszej procedurze wykorzystuje się do badania zmian napięcia powierzchniowego modelowego surfaktantu płucnego pod wpływem cząstek nanoproszków stosowanych na stanowiskach pracy. Badanie przeprowadza się z zastosowaniem tensjometru z pulsującym pęcherzykiem.

2. Zasada metody

W roztworze modelowego surfaktantu płucnego, w którym są zawieszone badane nanocząstki i który jest termostatowany w temperaturze zbliżonej do temperatury ciała człowieka, jest wytwarzany pęcherzyk powietrzny. Po czasie umożliwiającym adsorpcję nanocząstek na powierzchni ciec-zgaz pęcherzyk jest poddawany pulsacjom w zakresie odpowiadającym zmianom wielkości pęcherzyka płucnego w

cyklu oddechowym i częstotliwości odpowiadającej częstości oddechowej człowieka. Chwilowe napięcie powierzchniowe przy określonym promieniu pęcherzyka wyznacza się zgodnie z równaniem Younga-Laplace'a na podstawie pomiaru różnicy ciśnień między ciśnieniem atmosferycznym i ciśnieniem wewnątrz pęcherzyka.

3. Wytyczne ogólne

3.1. Sporządzanie roztworów

Do sporządzania roztworów surfaktantu płucnego należy używać jednorazowych naczyń laboratoryjnych, jednorazowych igieł i strzykawek oraz pipet z wymiennymi końcówkami.

3.2. Przechowywanie roztworów

Ampułkę z modelowym surfaktantem płucnym oraz jego roztwory należy przechowywać w lodówce w temperaturze $2 \div 8$ °C.

4. Materiały

4.1. Modelowy surfaktant płucny

Stosować preparat farmaceutyczny w formie zawiesiny do podawania dotchawicznego, reprezentujący właściwości fizykochemiczne naturalnego surfaktantu płucnego.

4.2. Jałowy roztwór chlorku sodu o stężeniu 9 mg/ml

Stosować jałowy roztwór chlorku sodu o stężeniu 9 mg/ml zwany w dalszej części procedury solą fizjologiczną.

5. Przyrządy pomiarowe i sprzęt pomocniczy

5.1. Waga laboratoryjna

Stosować wagę laboratoryjną umożliwiającą ważenie z dokładnością 0,1 mg/ml.

5.2. Płuczka ultradźwiękowa

Stosować płuczka ultradźwiękową umożliwiającą sonikację w zadanym czasie.

5.3. Łaźnia wodna

Stosować łaźnię wodną umożliwiającą termostatowanie próbek w temperaturze 37 °C.

5.4. Tensjometr z pulsującym pęcherzykiem

Stosować tensjometr z pulsującym pęcherzykiem umożliwiającym: termostatowanie próbki w tempe-

raturze 37 °C, wytworzenie pęcherzyka powietrznego o wielkości promienia $0,4 \div 0,55$ mm i przeprowadzenie jego pulsacji w zakresie częstotliwości $15 \div 30$ min⁻¹.

6. Procedury przygotowywania roztworów i zawiesin

W badaniach należy stosować próbki zawiesin nanocząstek w modelowym surfaktancie płucnym o objętości 1 ml. Próbki sporządzić przez dodanie 0,1 ml roztworu pośredniego modelowego surfaktantu płucnego (wg punktu 6.1.) do 0,9 ml roztworu stanowiącego mieszaninę roztworu podstawowego (wg punktu 6.2.) i roztworu soli fizjologicznej.

6.1. Roztwór pośredni modelowego surfaktantu płucnego

Ampułkę z preparatem farmaceutycznym wyjąć z lodówki i delikatnie obracać w celu przywrócenia zawiesinie właściwej konsystencji. Jednorazową strzykawką z jednorazową igłą pobrać z ampułki 0,5 ml preparatu. Zawartość strzykawki przenieść do fiolki z zamknięciem o pojemności 1,5 ml. Następnie dodać 0,5 ml roztworu soli fizjologicznej. Zawartość fiolki mieszać delikatnie przez pipetowanie, uważając, aby nie spowodować spienienia roztworu. Uzyskany w ten sposób roztwór pośredni modelowego surfaktantu płucnego o stężeniu 50-procentowym obj. wykorzystać do sporządzenia roztworu kontrolnego i próbek zawiesiny badanych nanocząstek w surfaktancie płucnym.

6.2. Roztwór podstawowy

Pipetą automatyczną z wymienną końcówką pobrać 10 ml roztworu soli fizjologicznej i przenieść do naczynia polipropylenowego z zamknięciem. Następnie odważyć 20 mg nanoproszku i przenieść do naczynia z solą fizjologiczną. Zamknięte naczynie wstawić do komory płuczki ultradźwiękowej i zawartość poddać sonikacji przez 5 min w celu rozbicia aglomeratów. Uzyskany w ten sposób roztwór podstawowy o stężeniu nanocząstek 2 mg/ml (a dokładniej zawiesinę nanocząstek w soli fizjologicznej) wykorzystać do sporządzenia zawiesiny badanych nanocząstek w modelowym surfaktancie płucnym.

6.3. Roztwór kontrolny

Korzystając ze wstępnie przygotowanego roztworu pośredniego modelowego surfaktantu płucnego (wg punktu 6.1.), sporządzić roztwór kontrolny będący 5-procentowym obj. roztworem preparatu farmaceutycznego w soli fizjologicznej. W tym celu pobrać pipetą automatyczną z jednorazową końcówką 0,9 ml soli fizjologicznej i przenieść do fiolki z zamknięciem o pojemności 1,5 ml. Następnie pobrać 0,1 ml roztworu pośredniego modelowego surfaktantu płucnego, przenieść do fiolki i delikatnie wymieszać przez pipetowanie, aby nie spowodować spienienia zawartości fiolki. Zamkniętą fiolkę umieścić w łaźni wodnej i termostatować w temperaturze 37 °C przez 15 min.

6.4. Zawiesiny nanocząstek w modelowym surfaktancie płucnym

Sporządzić zawiesiny nanocząstek w modelowym surfaktancie płucnym o stężeniach: 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 i 1 mg/ml, pobierając zgodnie z

tabelą 1. określone objętości roztworu pośredniego modelowego surfaktantu płucnego (wg punktu 6.1.), roztworu podstawowego (wg punktu 6.2.) i roztworu soli fizjologicznej.

W tym celu pobrać pipetą automatyczną z jednorazową końcówką odpowiednią objętość soli fizjologicznej i przenieść do fiolki z zamknięciem o pojemności 1,5 ml. Roztwór podstawowy dokładnie wymieszać przez wstrząsanie, następnie pobrać odpowiednią objętość roztworu i przenieść do fiolki. Zawartość fiolki wymieszać przez wstrząsanie. Pipetą automatyczną z jednorazową końcówką pobrać odpowiednią objętość roztworu pośredniego modelowego surfaktantu płucnego i przenieść do fiolki, zanurzając końcówkę pipety w jej zawartości. Wymieszać delikatnie przez pipetowanie, aby nie spowodować spienienia zawartości fiolki. Zamkniętą fiolkę umieścić w łaźni wodnej i termostatować w temperaturze 37 °C przez 15 min.

Tabela 1.

Objętości roztworów potrzebne do sporządzenia zawiesin nanocząstek w modelowym surfaktancie płucnym

Roztwory	Objętość roztworu, ml				
	stężenia cząstek w zawieszynie, mg/ml				
	0,1	0,25	0,5	0,75	1
Roztwór pośredni surfaktantu	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Roztwór podstawowy	0,050	0,125	0,250	0,375	0,500
Sól fizjologiczna	0,850	0,775	0,650	0,525	0,400

7. Kalibracja tensjometru

Co najmniej 2 h przed planowanymi badaniami napełnić wodą komorę termostatującą, włączyć tensjometr i uruchomić wewnętrzny termostat. Ustawić temperaturę termostatu na 37 °C. Każdorazowo przed przystąpieniem do pomiaru przeprowadzić kalibrację tensjometru zgodnie z zaleceniami producenta podanymi w instrukcji obsługi przyrządu.

8. Przeprowadzenie pomiarów

Przed przeprowadzeniem pomiaru wykonać kalibrację przyrządu i ustawić zadane tempo

pulsacji pęcherzyka powietrznego. Następnie pipetą automatyczną z jednorazową końcówką pobrać 40 µl roztworu kontrolnego (wg punktu 6.3.) i przenieść bardzo ostrożnie do jednorazowego naczynka pomiarowego umieszczonego w szczypcach pod kątem około 45°, aby nie wytworzyć w cieczy pęcherzyka powietrza. Naczynko pomiarowe z badaną próbką umieścić na tłoczku pulsatora w tensjometrze i tak podnieść komorę termostatującą tensjometru, aby naczynko pomiarowe z próbką zostało otoczone wodą o zadanej temperaturze. Następnie patrząc w okular mikroskopu, wytworzyć pęcherzyk powietrza o średnicy 0,8 mm podwieszony do kapilary wewnątrz naczynka pomiarowego.

Wiszący pęcherzyk pozostawić na 5 min, kontrolując czas stoperem. Po upływie 5 min rozpocząć pomiar chwilowego napięcia powierzchniowego. Czynności powyższe powtórzyć, wykonując badania próbek zawieszin nanocząstek w modelowym surfaktancie płucnym, które sporządzono zgodnie z punktem 6.4.

9. Opracowanie wyników pomiarów

Wyznaczyć przebiegi histerez napięcia powierzchniowego σ [(mN)/m] w funkcji zredukowanej powierzchni międzyfazowej A/A_{max} w cyklu ekspansja-kompresja:

$$\sigma = f\left(\frac{A}{A_{max}}\right),$$

gdzie:

A – wielkość powierzchni pęcherzyka podczas jego pulsacji obliczona, w przybliżeniu (przy zaniedbaniu pola przekroju kapilary, do której pęcherzyk jest podwieszony), na podstawie wzoru:

$$A = 4\pi r^2.$$

Dla każdej pętli histerezy obliczyć wartości następujących kryteriów ilościowych:

- wartość znormalizowanego pola histerezy napięcia powierzchniowego HA_n [(mN)/m] (Notter i in. 1982):

$$HA_n = \frac{\left[\int_A \sigma dA \right]_{\text{eksp.}} - \left[\int_A \sigma dA \right]_{\text{komp.}}}{A_{\text{max}} - A_{\text{min}}}$$

Obliczenia można przeprowadzić np. przez całkowanie numeryczne metodą trapezów

- minimalną wartość napięcia powierzchniowego σ_{min} [(mN)/m] podczas pulsacji pęcherzyka (w cyklu kompresja-ekspansja):

$$\sigma_{min} = \min \{ \sigma(A) \}$$

- wartość indeksu stabilności SI (Clements i in. 1961):

$$SI = \frac{\sigma_{\text{max}} - \sigma_{\text{min}}}{\frac{1}{2}(\sigma_{\text{max}} + \sigma_{\text{min}})}.$$

Dodatkowo należy określić zredukowane wartości kryteriów ilościowych charakteryzujące zmienność poszczególnych kryteriów ilościowych wyznaczonych przy kolejnych stężeniach nanocząstek w stosunku do kryteriów ilościowych opisujących modelowy surfaktant płucny:

- zredukowane znormalizowane pole histerezy napięcia powierzchniowego HA_{n-r} :

$$HA_{n-r} = \frac{\overline{HA}_{nc}}{\overline{HA}_{no}},$$

gdzie:

\overline{HA}_{nc} – średnia wartość znormalizowanego pola histerezy napięcia powierzchniowego HA_n wyznaczonego przy stężeniu c , [(mN)/m]

\overline{HA}_{no} – średnia wartość znormalizowanego pola histerezy napięcia powierzchniowego HA_n wyznaczonego dla czystego modelowego surfaktantu, [(mN)/m]

- zredukowane minimalne napięcie powierzchniowe σ_{min-r} :

$$\sigma_{min-r} = \frac{\bar{\sigma}_{minc}}{\bar{\sigma}_{min_o}},$$

gdzie:

$\bar{\sigma}_{minc}$ – średnia wartość minimalnego napięcia powierzchniowego σ_{min} wyznaczona przy stężeniu c , [(mN)/m]

$\bar{\sigma}_{min_o}$ – średnia wartość minimalnego napięcia powierzchniowego σ_{min} wyznaczona dla czystego modelowego surfaktantu, [(mN)/m]

- zredukowany indeks stabilności SI_r :

$$SI_r = \frac{\bar{SI}_c}{\bar{SI}_o},$$

gdzie:

$\bar{S}I_c$ – średnia wartość indeksu stabilności SI wyznaczonego przy stężeniu c , [-]

$\bar{S}I_o$ – średnia wartość indeksu stabilności SI wyznaczonego dla czystego modelowego surfaktantu, [-].

Obliczenia można przeprowadzić z wykorzystaniem programu komputerowego, np. Microsoft Office Excel.

INFORMACJE DODATKOWE

Badania wykonano, stosując:

- preparat farmaceutyczny SURVANTA (Beractantum; Abbott Laboratories, Francja) o stężeniu fosfolipidów 25 mg/ml, występujący w formie zawiesiny do podawania dotchawicznego
- jałowy roztwór chlorku sodu (Injectio natrii chlorati isotonica, Polpharma, Polska) o stężeniu 9 mg/ml
- tensjometr z pulsującym pęcherzykiem (Electronetics Corp., USA) w następujących warunkach pomiarowych:
 - temperatura układu 37 °C
 - tempo pulsacji pęcherzyka 15 pulsacji/min.

PIŚMIENNICTWO

- Clements J.A., Hustead R.F., Johnson R.P.* (1961) Pulmonary surface tension and alveolar stability. *Journal of Applied Physiology* 16, 444–450.
- Gradoń L., Podgórski A.* (1989) Hydrodynamical model of pulmonary clearance. *Chemical Engineering Science*, 44, 741–749.
- Halliday H.L.* (2008) Surfactants: past, present and future. *Journal of Perinatology* 28, 47–56.
- Kondej D., Sosnowski T.R.* (2010) The influence of metal-containing occupational dust on pulmonary surfactant activity. *Chemical Engineering Transactions* 19, 315–320.
- Lewis J.* (2006) Surfactant in lung injury: how important is it? *Journal of Organ Dysfunction* 2, 20–23.
- Notter R.H., Taubold R., Mavis R.D.* (1982) Hysteresis in saturated phospholipid films and its potential relevance for lung surfactant function in vivo. *Experimental Lung Research* 3, 109–127.