

Agata PENCONEK, Magdalena LASOTA, Arkadiusz MOSKAL

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

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

Badanie dyfuzji agregatów sadzy (DEP) w warstwie śluzu

Wstęp

Agregaty sadzy DEP (*Diesel Exhaust Particles*) emitowane przez silnik diesla to fraktalopodobne struktury o skomplikowanej powierzchni i kształcie. Ich wymiar waha się od 10 aż do 10 000 nm w zależności od rodzaju użytego paliwa, wieku samochodu, jego stanu technicznego czy obciążenia. Czynniki te nie tylko determinują wielkość agregatów DEP, ale również wpływają na morfologię oraz związki zaadsorbowane na ich powierzchni.

Agregaty DEP, tak zresztą jak i spaliny z silników diesla, są rakotwórcze dla człowieka [LARC, 2012], ponieważ wielkość agregatów sadzy pozwala na swobodną depozycję w drzewie oskrzelowym. Na szczęście natura nie pozostawiła człowieka bezbronny. Jednym z mechanizmów ochronnych organizmu przed patogenami, pochodzącymi ze środowiska zewnętrznego, jest warstwa śluzu, która wyścielając drogi oddechowe stanowi swoistą pułapkę dla zdeponowanych na niej cząstek.

Śluz naturalny, niezależnie od miejsca sekrecji, w znakomitej większości składa się z wody (~95%), glikoprotein i lipidów (0,5÷5%), związków mineralnych (0,5÷1%) oraz białek (1%) [Khanvilkar i in., 2001]. Choć ogólne proporcje poszczególnych składników śluzu są takie same, to w zależności od miejsca jego wytwarzania (przewód pokarmowy, oddechowy, górne drogi oddechowe czy też dolne drogi oddechowe) udział poszczególnych frakcji może być różny. Nie bez znaczenia dla składu śluzu pozostają również infekcje i choroby występujące w miejscach jego sekrecji.

Badania prowadzone dotychczas na świecie skupiały się głównie na oddziaływaniu agregatów DEP na komórki organizmów, określając ich wpływ na procesy nowotworzenia, stres komórkowy czy związek z pojawieniem się odpowiedzi zapalnej. Brak jest jednak badań pozwalających określić jak naturalne mechanizmy obronne organizmu radzą sobie z fraktalopodobnymi nanostrukturami, jakimi są agregaty sadzy.

Dlatego celem niniejszej pracy było zbadanie szybkości dyfuzji agregatów DEP w warstwie śluzu. Rezultaty badań pozwoliły odpowiedzieć na pytanie, czy śluz w drogach oddechowych chroni nas również przed agregatami DEP?

Materiały i metoda

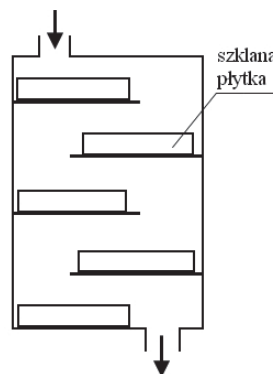
Agregaty DEP

W badaniach określono współczynnik dyfuzji trzech typów agregatów DEP przez warstwę sztucznego śluzu. Agregaty DEP uzyskano ze spalania trzech różnych olejów napędowych w wysokopiętnym silniku diesla (Mercedes, 1982r, 4 cylindry, pojemność 2399 cm³). Szczegółowy opis stanowiska badawczego do generowania spalin można odnaleźć w pracy Penconek i Moskala [2010]. Charakterystykę agregatów DEP wykorzystywanych w badaniu podano w tab. 1.

Tab. 1. Charakterystyka agregatów DEP, (d_p – średnia średnica agregatu, nm)

Ozn.	Pochodzenie	Kształt	Szacowany wymiar fraktalny	d_p , nm
DEP I	ON verva	dendrytyczny	1,7	30
DEP II	biodiesel	zwarty	2,5	60
DEP III	ecodiesel	dendrytyczny	1,7	117

Agregaty DEP ze spalin z silnika diesla deponowano na szklanych płytkach umieszczonych w urządzeniu, którego schemat przedstawiono na rys. 1. Urządzenie podłączone było bezpośrednio do rury wydechowej.



Rys. 1. Schemat urządzenia do depozycji agregatów DEP

Sztuczny śluz

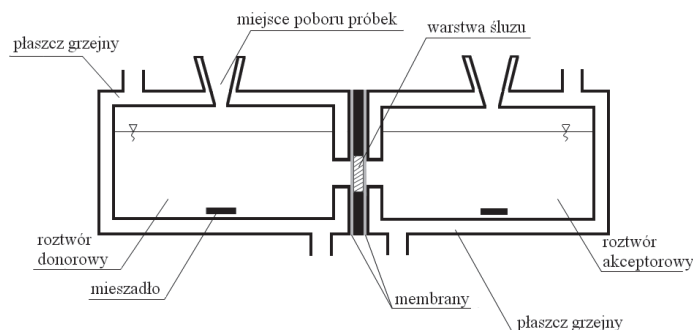
Do badań dyfuzji wykorzystano sztuczny śluz o uproszczonym składzie: mucyna typu II (17%) (SIGMA Aldrich, USA), azydek sodu (0,002%) (POCh, Polska) rozpuszczone w buforze HEPES 99%/ACROS (POCh, Polska), pH 7,4.

Nieuzywanie w badaniu prawdziwego śluzu podyktowane było kilkoma powodami. Śluz w zależności od miejsca produkcji w drogach oddechowych oraz stanu zdrowia dawcy, cech osobniczych, a także aktualnych warunków atmosferycznych (temperatura, wilgotność) wykazuje różnice w składzie i lepkości, co mogłoby wpłynąć na powtarzalność wyników. Ponadto pozyskanie śluzu od dawcy jest nietatwe i niejednokrotnie kłopotliwe.

Celka pomiarowa

Badania prowadzono w celce do badania dyfuzji, której konstrukcja opierała się na budowie celki przedstawionej w pracy Desai i Vadgama [1991]. Schemat celki pomiarowej pokazano na rys. 2.

Celka składała się z części donorowej wypełnionej zawiesiną agregatów DEP w wodzie oraz części akceptorowej wypełnionej wodą z instalacji RO (PURICOM). Pomiędzy częścią donorową i akceptorową umieszczano membrany syntetyczne o średnicy porów 100 nm (DURAPORE, MILLIPORE, Irlandia) oraz przygotowany śluz (wariant I) lub roztwór buforowy (wariant II). Warstwa śluzu miała grubość 0,15 cm. W wariantcie II warstwę śluzu zastąpiono wodą.



Rys. 2. Celka do pomiaru dyfuzji

Metoda badawcza

Agregaty DEP przed umieszczeniem w celce pomiarowej po stronie donorowej inkubowano w roztworze 1:1 20% KOH (Chemipur, Polska) i 96% EtOH przez 48 godzin. Po tym czasie oddzielano agregaty DEP od roztworu wirując zawiesinę przez 30 min przy obrotach 6000 obr/min (MPW – 56, Polska). Supernatant zlewano, a zawieszono w wodzie

agregaty poddawano sonikacji w myjce ultradźwiękowej (*Polsonic*, typ *sonic 14*, Polska) przez 3 minuty.

Takiej samej procedurze poddawane były agregaty DEP wykorzystywane do stworzenia krzywej wzorcowej.

2,5 ml tak przygotowanej zawiesiny wprowadzano do części donorowej celki pomiarowej. Część akceptorową wypełniano 2,5 ml wody. Dyfuzję prowadzono w 37°C. Roztwory donorowy i akceptorowy były intensywnie mieszane w czasie procesu. Oznaczenia ilości cząstek przechodzących przez warstwę śluzu oraz membranę dokonano spektrofotometrycznie (*Genesys 10S UV-VIS*, *Thermo Scientific*, USA) przy długości fali 750 nm, względem wody z instalacji RO jako próby odniesienia.

Pomiary absorbancji roztworów po stronie donorowej i akceptorowej dokonywano w 30, 90 i 180 minucie procesu.

Sposób przygotowania agregatów DEP przed pomiarem oraz sposób ich oznaczania był zmodyfikowaną metodą zaproponowaną w pracy [Rudd i Strom, 1981].

Współczynnik dyfuzji agregatów DEP przez warstwę śluzu

Współczynnik dyfuzji agregatów DEP przez warstwę śluzu został określony przy założeniu, że gradient stężenia agregatów DEP po stronie donorowej i akceptorowej jest stały w czasie trwania procesu [Desai i Vadgama, 1991]:

$$\frac{dc}{dt} = D \frac{d^2c}{dx^2} \quad (1)$$

warunki brzegowe:

$$c = c_1 \quad \text{dla} \quad x = 0$$

$$c = c_2 \quad \text{dla} \quad x = 0,15$$

gdzie:

c – stężenie agregatów DEP (1 – str. donor, 2 – str. akcept.), [mg/ml]

D – współczynnik dyfuzji, [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]

t – czas, [s]

x – grubość warstwy śluzu, (przyjęto $x = 0,15$ cm).

Dla przyjętego założenia o stanie ustalonym równ. (1) sprowadza się do równania:

$$0 = D \frac{d^2c}{dx^2} \quad (2)$$

Rozwiązując równ. (2) dla przedstawionych warunków brzegowych otrzymano zależność na współczynnik dyfuzji w postaci:

$$D = \frac{0,15}{A(c_1 - c_2)} \frac{d\Delta m}{dt} \quad (3)$$

gdzie:

A – powierzchnia zajmowana przez warstwę śluzu, [cm^2]

Δm – całkowita masa agregatów DEP dyfundujących przez warstwę śluzu, [mg].

Wartość $d\Delta m/dt$ dla stanu ustalonego została wyznaczona ze współczynnika kierunkowego prostej obrazującej zależność $\Delta m = f(t)$. Wartość $d\Delta m/dt$ wykorzystana do obliczenia współczynnika dyfuzji jest uśrednioną wartością uzyskaną z czterech powtórzeń prowadzonych dla każdego z typu agregatów DEP i każdego wariantu.

Kwadrat współczynnika korelacji (R^2) dla każdej krzywej aproksymującej wartości eksperymentalne w celu wyznaczenia $d\Delta m/dt$ zawierał się w przedziale 0,84÷0,99 dla wariantu ze śluzem oraz 0,97÷1 dla wariantu z wodą.

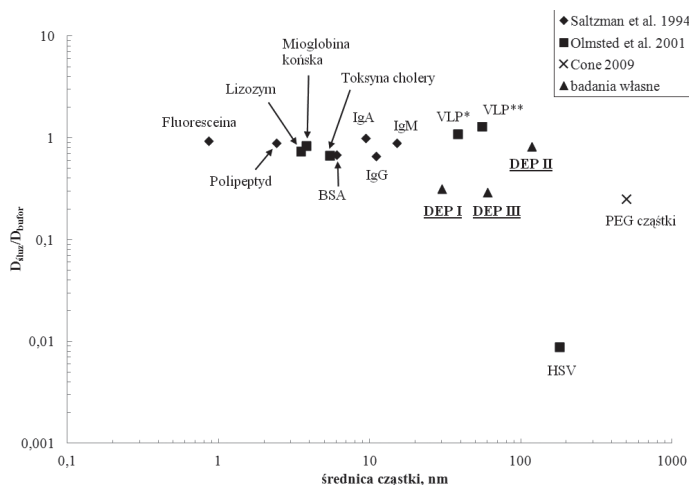
Wyniki badań

Współczynniki dyfuzji uzyskane na podstawie równ. (3) zestawiono w tab. 2.

Tab. 2. Współczynniki dyfuzji dla trzech typów agregatów DEP w układzie ze śluzem i wodą

	$D \cdot 10^7$ [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]		$D_{\text{śluz}}/D_{\text{woda}}$
	śluz	woda	
DEP I, 30 nm, dendrytyczne	0,545 ± 0,003	1,702 ± 0,170	0,32
DEP II, 117 nm, dendrytyczne	2,110 ± 1,290	2,551 ± 0,930	0,83
DEP III, 60 nm, zwarte	0,506 ± 0,470	1,715 ± 0,070	0,30

Na rys. 3 zestawiono uzyskane współczynniki dyfuzji z współczynnikami dyfuzji cząstek o średnicy od 0,84 nm (fluoresceina) do 500 nm (cząstki PEG – *polyethylene glycol-grafted polystyrene particles*).



Rys. 3. Współczynnik dyfuzji w śluzie/współczynnik dyfuzji w buforze. BSA – surowicza albumina wołowa, Ig A, G, M – przeciwciała ludzkie, VLP*** – wirus brodawczaka ludzkiego różnych typów, HSV – wirus opryszczki, cząstki PEG (Polyethylene glycol-grafted polystyrene particles)

Wnioski

Współczynnik dyfuzji agregatów DEP II przez warstwę śluzu wpisuje się w trendy uzyskane dla biologicznych cząstek o rozmiarach do 500 nm.

Dla znacznie mniejszych agregatów (DEP I i III) współczynnik dyfuzji jest o 50% niższy niż uzyskany dla cząstek o podobnych rozmiarach (VLP* **).

Niemniej jednak wszystkie trzy typy agregatów DEP wolniej dyfundują przez śluz niż bez bufor, co pozwala na wysunięcie wniosku o ochronnej roli błony śluzowej również względem agregatów sadzy.

Ze względu na złożoność układu (dyfuzja agregatów fraktalopodobnych w płynie nienewtonowskim), niezbędne są dalsze badania, które pozwolą określić zmiany, jakim podlegają agregaty DEP w kontakcie z wodą i w trakcie dyfuzji przez śluz.

LITERATURA

- Cone R.A., 2009. Barrier properties of mucus. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **61**, 75-85. DOI: 10.1016/j.addr.2008.09.008
- Desai M., Vadgama P., 1991. Estimation of effective diffusion coefficients of model solutes through gastric mucus: assessment of a diffusion chamber technique based on spectrophotometric analysis. *Analyst*, **116**, 1113-1116. DOI: 10.1039/an9911601113
- IARC, 2012. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. vol. 105: Diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes. Lyon, France: 5-12 June 2012
- Khanvilkar K., Donovan M.D., Flangan D.R., 2001. Drug transfer through mucus. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **48**, 173-193. DOI: 10.1016/S0169-409X(01)00115-6
- Penconek A., Moskal A., 2010. Budowa stanowiska do generowania i analizy spalin z wysokoprężnego silnika diesla. *Inż. Ap. Chem.*, **49**, nr 1, 83-84
- 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
- Olmsted et al., 2001. Diffusion of macromolecules and virus-like particles in human cervical mucus. *Biophys. J.*, **81**, 1930-1937. DOI: 10.1016/S0006-3495(01)75844-4
- Saltzman W.M., Radomsky M.L., Whaley K.J., Cone R.A., 1994. Antibody diffusion in human cervical mucus. *Biophys. J.*, **66**, 508-515. DOI: 10.1016/S0006-3495(94)80802-1

Praca naukowa była częściowo finansowana: ze środków budżetowych na naukę w latach 2010-2013 jako projekt badawczy nr NN209023739 oraz ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2012/05/N/ST8/03018.