

Metoda badania wpływu nanocząstek na właściwości powierzchniowe monowarstwy głównego składnika surfaktantu płucnego (DPPC) w układzie wagi Langmuira-Wilhelmy'ego¹

mgr inż. DOROTA KONDEJ¹

e-mail: dokon@ciop.pl

dr hab inż. TOMASZ R. SOSNOWSKI, prof. nadzw. PW²

¹ Centralny Instytut Ochrony Pracy –

Państwowy Instytut Badawczy

00-701 Warszawa, ul. Czerniakowska 16

² Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej

Politechniki Warszawskiej

00-645 Warszawa, ul. Waryńskiego 1

Słowa kluczowe: nanocząstki, surfaktant płucny, DPPC, ciśnienie powierzchniowe, monowarstwa.

Keywords: nanoparticles, pulmonary surfactant, DPPC, surface pressure, monolayer.

Streszczenie

Metodę stosuje się do badania wpływu cząstek nanoproszków występujących na stanowiskach pracy na właściwości powierzchniowe głównego składnika surfaktantu płucnego – dipalmitylofosfatydylocholino (DPPC).

Badania polegają na wyznaczeniu zmian ciśnienia powierzchniowego podczas kompresji monowarstwy DPPC utworzonej na powierzchni roztworu chlorku sodu o stężeniu 9 mg/ml zawierającego

badane nanocząstki.

Ocenę wpływu nanocząstek na właściwości powierzchniowe monowarstwy DPPC przeprowadza się na podstawie analizy przebiegu izotermi kompresji monowarstwy utworzonej na powierzchni czystej fazy ciekłej oraz izotermi kompresji monowarstwy utworzonej na powierzchni zawiesin o różnych stężeniach nanocząstek.

¹ Publikacja przygotowana na podstawie wyników uzyskanych w ramach II etapu programu wieloletniego „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.

Summary

This method is used to study the influence of particles of nanopowders on the surface properties of the main component of the pulmonary surfactant - dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). The study consists in determining the changes in the surface pressure during the compression of DPPC monolayer formed on a surface of a suspension of the particles in saline. The assessment of the impact of

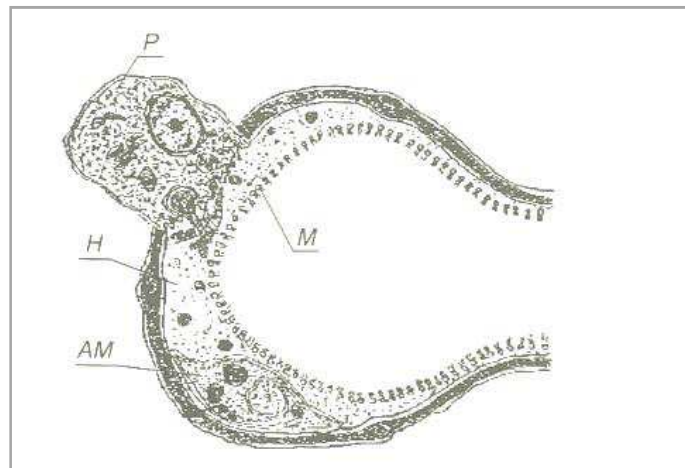
nanoparticles on the surface properties of DPPC monolayer is carried out on the basis of the analysis of the compression isotherm of monolayer formed on the surface of a pure liquid phase and the compression isotherms of monolayer formed on the surface of the suspensions of various concentrations of nanoparticles.

WPROWADZENIE

Struktura układu surfaktantu płucnego

Surfaktant płucny stanowi pierwszą barierę, która oddziela wdychane powietrze docierające do pęcherzyków płucnych od tkanki przegrody między-

pęcherzykowej, zawierającej kapilary krwionośne (Enhorning 2008; Orgeig i in. 2004; Wright 2003). Zgodnie z teorią Clementsa (Clements i in. 1958) nabłonek pęcherzyka płucnego pokryty jest cienką warstwą cieczy o grubości około 0,1 μm tworzącą hipofazę (H), (rys. 1.).



Rys. 1. Struktura układu surfaktantu płucnego wg koncepcji Clementsa: H – warstwa cieczy tworząca hipofazę, AM – makrofag płucny, M – zaadsorbowana monowarstwa surfaktantu, P – pneumocyt II typu (Sosnowski 2006)

Na powierzchni hipofazy (H) występują substancje powierzchniowo czynne, które tworzą warstwę o grubości jednej cząsteczki, czyli monowarstwę (M). Zespół związków powierzchniowo czynnych zaadsorbowanych na powierzchni hipofazy zwany jest surfaktantem płucnym. Na rysunku 1. uwidoczniło również pneumocyt II typu (P) oraz makrofag płucny (AM). Pneumocyty II typu są wyspecjalizowanymi komórkami, które: produkują, magazynują oraz wydzielają większość składników surfaktantu płucnego. Makrofagi płucne (komórki żerne) uczestniczą w usuwaniu zbędnych cząstek związków tworzących surfaktant płucny, a także biorą udział w fagocytozie mikro-

organizmów i zanieczyszczeń występujących we wdychanym powietrzu (Bachofen i in. 2005; Perez-Gil 2008; Saxena 2005, Kanishtha i in. 2006).

Rola surfaktantu płucnego

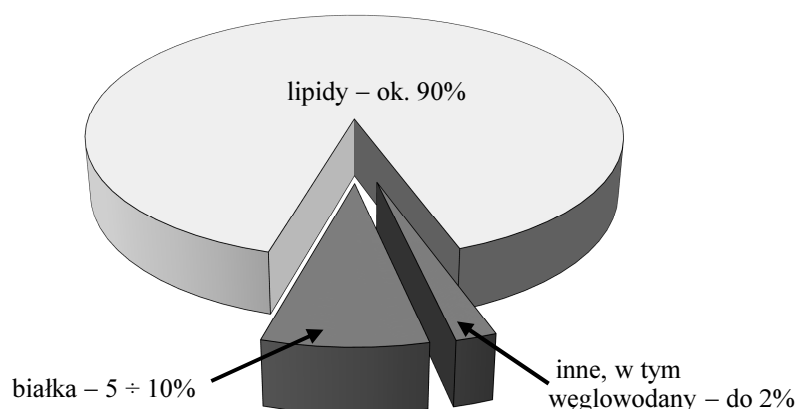
Surfaktant płucny odgrywa ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu, ulegając adsorpcji na powierzchni międzyfazowej ciecz-gaz ciekłej wyściółki pęcherzyków płucnych, pełni rolę regulatora wartości napięcia powierzchniowego podczas oddychania. Przyczynia się on do obniżenia napięcia powierzchniowego w pęcherzykach płucnych, co zapobiega ich zapadaniu się w

końcowej fazie wydechu, zwiększa stabilność struktury pęcherzyków płucnych i zapobiega obrzękowi płuc. Surfactant płucny spełnia ponadto bardzo ważną funkcję obronną, która polega m.in. na umożliwianiu przemieszczania się zdeponowanych cząstek (np. pyłów występujących w środowisku pracy) do wyższych pięter drzewa oskrzelowego. Proces ten przebiega dzięki tzw. efektom Marangoniego – przepływowi warstwy cieczy, napędzanym przez gradienty napięcia powierzchniowego powstające w układzie surfaktantu płuc-

nego o specyficznej, dynamicznej aktywności powierzchniowej (Gradoń, Podgórski 1989; Podgórski, Gradoń 1993; Sosnowski 2008).

Skład surfaktantu płucnego

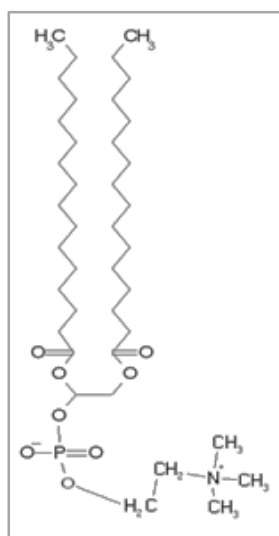
Surfactant płucny (rys. 2.) jest mieszaniną lipidów (około 90% wagowych) i białek (około 10%) (Tzortzaki i in. 2007; Alonso i in. 2004; Saxena 2005).



Rys. 2. Skład surfaktantu płucnego

Największą grupę lipidów (80 ÷ 90% wagowych) stanowią fosfolipidy, wśród których dominujący udział wagowy (około 80%) stanowią fosfatydylocholiny. Głównym związkiem w tej grupie jest L- α -dipalmitoylofosfatydylocholina (DPPC), która wraz z białkami surfaktantu płucnego odgrywa zasadniczą rolę w obniżaniu

napięcia powierzchniowego pęcherzyków płucnych podczas wydechu (Tzortzaki i in. 2007). Szczególne właściwości powierzchniowe DPPC wynikają z jej budowy cząsteczkowej. Na rysunku 3. przedstawiono wzór strukturalny cząsteczki DPPC.



Rys. 3. Budowa cząsteczki DPPC

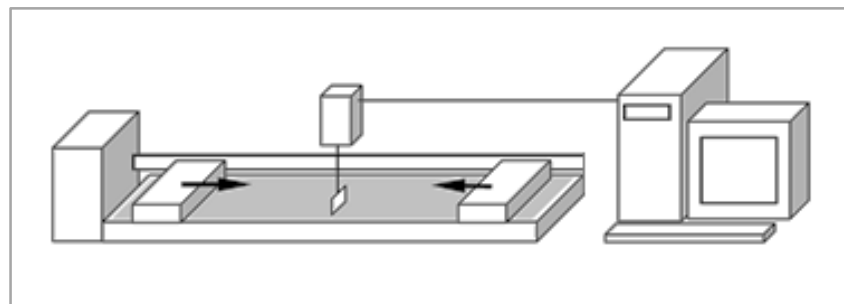
Cząsteczka DPPC ma budowę amfifilową: z polarną zwartą grupą o właściwościach hydrofilowych i dwoma niepolarnymi łańcuchami węglowodorowymi o właściwościach hydrofobowych. Grupę hydrofilową w cząsteczce DPPC stanowi grupa fosfocolinowa, która ma charakter podwójnego jonu. Jest ona silnie hydratowana przez cząsteczki wody i jest w stanie wiązać od 12 do 15 jej cząsteczek (Sundler 1989). Dzięki temu zostaje osiągnięta odpowiednia konfiguracja grupy hydrofilowej gwarantująca stabilność monowarstwy. Zdolność tej grupy do hydratacji uzyskuje się w szerokim zakresie stężeń pH i stężeń soli. Obecność grupy hydrofobowej tworzonej przez dwa nasycone i proste 16-węglowe łańcuchy umożliwia cząsteczce DPPC pozostawanie na powierzchni międzyfazowej nawet podczas intensywnej jej kompresji (Wüstneck i in. 1999). Dodatkowo łańcuchy węglowodorowe są odporne na utlenianie i dzięki temu nie są degradowane przez tlen zawarty w powietrzu. Ten aspekt jest szczególnie ważny ze względu na fakt, że surfaktant płucny i jego składniki pozostają w kontakcie z powietrzem docierającym do pęcherzyków płucnych.

Badanie właściwości powierzchniowych monowarstwy

Wytworzenie stabilnej monowarstwy wymaga adsorpcji na powierzchni cieczy cząsteczek substancji, które mają charakter amfifilowy, tzn. składają się zarówno z części hydrofobowej (niepolarnej, np. łańcuchy lub pierścienie węglowodorowe), jak i hydrofilowej (polarnej, np.: COOH, -OH, -NH₂). Cząsteczka taka z przyczyn energetycznych lokuje się na powierzchni w ściśle określony sposób: częścią hydrofilową w środowisku wodnym, zaś częścią hydrofobową poza nim. Trwałość lokalizacji i orientacji

cząsteczki na powierzchni międzyfazowej jest uzależniona od bilansu oddziaływań poszczególnych fragmentów cząsteczki z graniczącymi ze sobą ośrodkami. Stężenie cząsteczek zawierających w swej strukturze część hydrofilową na powierzchni wody jest jednakowe, dzięki natychmiastowemu rozplywowi na powierzchni. W warunkach laboratoryjnych można to uzyskać, nanosząc krople roztworu badanej substancji w lotnym i niemieszającym się z wodą rozpuszczalniku organicznym. Krople te rozplywają się bardzo szybko po powierzchni. Cząsteczki badanej substancji są początkowo zorientowane na powierzchni woda-rozpuszczalnik, a po odparowaniu rozpuszczalnika zostają zaadsorbowane na powierzchni woda-powietrze.

Do badań właściwości powierzchniowych czynnych warstw jednocząsteczkowych (monowarstw) związków zaadsorbowanych na powierzchni faza ciekła-powietrze stosuje się m.in. wagę Langmuira, w której napięcie (lub ciśnienie) powierzchniowe jest wyznaczane z bezpośredniego pomiaru siły działającej na pływak (waga Langmuira) lub zanurzoną płytkę (waga Langmuira-Wilhelmy'ego), (Wüstneck i in. 2005; Guzman i in. 2012; Sakai, Umemura 2008). Waga Langmuira-Wilhelmy'ego stanowi modyfikację wagi Langmuira. W wadze Langmuira-Wilhelmy'ego jest zastosowany symetryczny ruch barierek po powierzchni cieczy wywodzący się z klasycznej metody pomiarowej Langmuira oraz płytkowa technika pomiaru napięcia powierzchniowego związana z metodą pomiarową Wilhelmy'ego. Wspomniane przyrządy umożliwiają badanie właściwości powierzchniowych przy zmieniającej się wielkości powierzchni międzyfazowej ciecz-powietrze. Na rysunku 4. przedstawiono schemat ideowy wagi Langmuira-Wilhelmy'ego.



Rys. 4. Schemat i zasada działania wagi Langmuira-Wilhelmy'ego

Waga Langmuira-Wilhelmy'ego składa się z płytkiego wypełnionego cieczą prostopadłościennego naczynia, zwanego korytkiem Langmuira. Po powierzchni cieczy są przesuwane z zadaną prędkością dwie niezwilżalne barierki, powodujące kompresję lub ekspansję powierzchni zawartej między nimi. W równej odległości między barierkami jest umieszczona płytka zwana płytką Wilhelmy'ego, zanurzona w cieczy do około 1/3 swojej wysokości i podwieszona na haczyku połączonym z czujnikiem siły. Za pomocą tej płytki dokonywane jest pomiaru chwilowego ciśnienia powierzchniowego. Ciśnienie powierzchniowe π definiuje się jako:

$$\pi = \sigma_c - \sigma,$$

gdzie:

σ_c – wartość napięcia powierzchniowego czystej cieczy (hipofazy) w temperaturze pomiaru,
 σ – chwilowa wartość napięcia powierzchniowego w badanym układzie.

Analiza zależności ciśnienia powierzchniowego π od pola powierzchni A przypadającego na jedną cząsteczkę DPPC podczas kompresji monowarstwy przeprowadzonej w stałej temperaturze oraz ze stałą szybkością może być podstawą do oceny właściwości powierzchniowych monowarstwy głównego składnika surfaktantu płucnego.

Badanie wpływu nanocząstek stosowanych na stanowiskach pracy na właściwości powierzchniowe monowarstwy głównego składnika surfaktantu płucnego (DPPC)

W Centralnym Instytucie Ochrony Pracy – Państwowym Instytucie Badawczym są prowadzone badania oddziaływania wybranych nanocząstek glinokrzemianów stosowanych w produkcji nanokompozytów polimerowych na surfaktant płucny. Nanocząstki glinokrzemianów są wykorzystywane jako nanonapełniacze w produkcji nowoczesnych tworzyw sztucznych. Wprowadzenie nanonapełniaczy poprawia właściwości wytrzymałościowe i fizykochemiczne nanokompozytów polimerowych, m.in. powoduje: wyraźne zwiększenie modułu elastyczności, większą stabilność termiczną, zwiększone właściwości barierowe, odporność na rozpuszczalniki organiczne, większy współczyn-

nik tłumienia ognia, lepsze właściwości optyczne oraz mniejszy współczynnik rozszerzalności liniowej (Kacperski 2003; Malesa 2004). W ramach realizacji projektu opracowano metodę badania wpływu cząstek nanoproszków występujących na stanowiskach pracy na dynamiczne napięcie powierzchniowe modelowego surfaktantu płucnego w układzie pulsującego pęcherzyka (Kondej, Sosnowski 2012) oraz metodę badania wpływu nanocząstek na właściwości powierzchniowe monowarstwy głównego składnika surfaktantu płucnego (DPPC) w układzie wagi Langmuira-Wilhelmy'ego.

Zasada metody

Badania wpływu wybranych nanocząstek glinokrzemianów na właściwości powierzchniowe monowarstwy głównego składnika surfaktantu płucnego (DPPC) przeprowadzono w układzie wagi Langmuira-Wilhelmy'ego. Polegały one na wytworzeniu monowarstwy DPPC na powierzchni fazy ciekłej przez naniesienie roztworu chloroformowego DPPC i odparowanie rozpuszczalnika. Powstałą w ten sposób monowarstwę o grubości jednej cząsteczki DPPC poddawano następnie kompresji w stałej temperaturze z zadaną szybkością, w celu wyznaczenia chwilowych wartości ciśnienia powierzchniowego. Analiza przebiegu izotermy kompresji monowarstwy DPPC utworzonej na powierzchni czystej fazy ciekłej (bez dodatku badanych nanocząstek) oraz izoterm kompresji monowarstw DPPC utworzonych na powierzchni zawiesin o różnych stężeniach nanocząstek umożliwiła określenie wpływu nanocząstek glinokrzemianów na właściwości powierzchniowe monowarstwy DPPC.

Roztwory i zawiesiny

W badaniach stosowano chloroformowy roztwór DPPC o stężeniu 1 mg/ml sporządzony na bazie preparatu 1,2-dipalmitylo-*sn*-glicero-3-fosfocholiny (DPPC) o masie molowej 734,1 g/mol (nr CAS 63-89-8) i czystości 99-procentowej (Sigma-Aldrich).

Badania przeprowadzono, stosując zawiesiny wybranych glinokrzemianów o stężeniach nanocząstek: 0,25; 0,5 i 1 mg/ml, sporządzone w soli fizjologicznej stanowiącej roztwór chlorku sodu o

stężeniu 9 mg/ml (Baxter Manufacturing, Polska). Zastosowanie roztworu chlorku sodu w roli hipofazy było uzasadnione przybliżeniem warunków pomiarowych do warunków fizjologicznych. Zawiesiny poddawano sonikacji w płuczce ultradźwiękowej Sonic 14 (Polsonic, Polska) w celu rozbicia aglomeratów. Przyjęty czas sonikacji został ustalony na podstawie analizy wyników pomiarów wielkości cząstek przeprowadzonych metodą DLS (ang. *dynamic light scattering*), opartą na zjawisku dynamicznego rozpraszania promieniowania laserowego przez cząstki znajdujące się w zawiesinie, przy wykorzystaniu analizatora Zetasizer 3000 (Malvern, UK).

Parametry układu pomiarowego

Badania wpływu nanocząstek glinokrzemianów na właściwości powierzchniowe monowarstwy DPPC prowadzono z wykorzystaniem wagi Langmuira-Wilhelmy'ego model MiniTrough LB5000 (KSV Instruments Ltd., Finlandia). Korytko Langmuira oraz barierki w urządzeniu stosowanym w badaniach były wykonane z teflonu, który nie jest zwilżany przez wodę. Płytko Wilhelmy'ego była wykonana ze stopu platyny. Korytko Langmuira było ogrzewane wodą termosta-

owaną uprzednio w łaźni wodnej NESLAB model GP-200 (NESLAB Instruments Inc., USA) i przepompowywaną do kanałów w podstawie korytka. W celu zachowania dużej wilgotności powietrza (około 100%) oraz stałej temperatury, urządzenie umieszczono w komorze powietrznej wykonanej ze szkła akrylowego.

Pomiar napięcia powierzchniowego odbywał się na podstawie mierzonej elektronicznie i na bieżąco rejestrowanej przez komputer wartości siły wciągającej płytkę do wnętrza cieczy. Komputerowo sterowano również ruch barierki. Do programowania doświadczeń, rejestracji i wstępnej obróbki wyników stosowano specjalistyczne oprogramowanie LB5000 (KSV Instruments Ltd., Finlandia).

Badania wpływu nanocząstek glinokrzemianów na właściwości powierzchniowe monowarstwy DPPC prowadzono w temperaturze 37 °C i przy szybkości kompresji powierzchni 37,5 cm²/min i 75 cm²/min.

W zaprezentowanej procedurze badawczej przedstawiono dokładny sposób przygotowania roztworu DPPC i zawiesin nanocząstek, metodę prowadzenia pomiarów oraz opracowanie wyników badań.

PIŚMIENNICTWO

- Alonso C., Alig T., Yoon J., Bringezu F., Warriner H., Zasadzinski J.A. (2004) More than a monolayer: relating lung surfactant structure and mechanics to composition. *Biophysical Journal* 87, 4188–4202.
- Bachofen H., Gerber U., Gehr P., Amrein M., Schürch S. (2005) Structures of pulmonary surfactant films adsorbed to an air-liquid interface in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes* 1720(1-2), 59–72.
- Clements J.A., Brown E.S., Johnson R.P. (1958) Pulmonary surface tension and the mucus lining of the lungs: some theoretical considerations. *Journal of Applied Physiology* 12, 262–268.
- Enhorning G. (2008). Surfactant in airway disease. *Chest* 133, 975–980.
- Gradoń L., Podgórski A. (1989) Hydrodynamical model of pulmonary clearance. *Chemical Engineering Science* 44, 741–749.
- Guzman E., Liggieri L., Santini E., Ferrari M., Ravera F. (2012) Influence of silica nanoparticles on phase behavior and structural properties of DPPC – palmitic acid Langmuir monolayers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 413, 280–287.
- Kacperski M. (2003) Nanokompozyty polimerowe. *Kompozyty* 3, 225–232.
- Kanishtha T., Banerjee R., Venkataraman C. (2006) Effect of particle emissions from biofuel combustion on surface activity of model and therapeutic pulmonary surfactants. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 22, 325–333.
- Kondej D., Sosnowski T.R. (2012) Metoda badania wpływu nanocząstek na dynamiczne napięcie powierzchniowe modelowego surfaktantu płucnego w układzie pulsującego pęcherzyka. *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy* 1(71), 5–11.
- Kondej D., Sosnowski T.R. (2013) Alteration of biophysical activity of pulmonary surfactant by aluminosilicate nanoparticles. *Inhalation Toxicology* 25(2), 77–83.
- Malesa M. (2004) Nanonapełniacze kompozytów polimerowych. *Elastomery* 8(3), 12–17.
- Orgeig S., Daniels C.B., Sullivan L.C. (2004) Development of the pulmonary surfactant system. W: Harding R., Pinkerton K., Plopper C. (Eds.). *The Lung: development, aging and the environment*. Academic Press, London, 149–167.

- Perez-Gil J. (2008) Structure of pulmonary surfactant membranes and films: the role of proteins and lipid-protein interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778, 1676–1695.
- Podgórski A., Gradoń L. (1993) An improved mathematical model of hydrodynamical self-cleansing of pulmonary alveoli. *Annals of Occupational Hygiene* 37, 347–365.
- Sakai H., Umemura J. (2008) Evaluation of structural change during surface pressure relaxation in Langmuir monolayer of zinc stearate by infrared external reflection spectroscopy. *Colloid and Polymer Science*, 286, 1637–1641.
- Saxena S. (2005) Lung surfactant. The indispensable component of respiratory mechanics. *Resonance* 10(8), 91–96.
- Sosnowski T.R. (2006) Efekty dynamiczne w układach ciecz-gaz z aktywną powierzchnią międzyfazową. *Prace Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej*, XXX, z. 2.
- Sosnowski T.R. (2008) Properties of surfactant-enriched air-water interface under dynamic conditions. *Chemical and Process Engineering* 29, 305–315.
- Sundler R. (1989) Surface stabilizing properties of phospholipids. [W:] *Surfactant and the respiratory tract*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 33–38.
- Tzortzaki E.G., Vlachaki E., Siafakas N.M. (2007) Pulmonary surfactant. *Pneumon* 20(4), 364–371.
- Wüstneck R., Perez-Gil J., Wüstneck N., Cruz A., Fainerman V.B., Pison U. (2005) Interfacial properties of pulmonary surfactant layers. *Advances in Colloid and Interface Science* 117, 33–58.
- Wüstneck R., Wüstneck N., Grigoriev D.O., Pison U., Miller R. (1999) Stress relaxation behaviour of dipalmitoyl phosphatidylcholine monolayers spread on the surface of pendant drop. *Colloids and Surface B: Biointerfaces* 15, 275–288.
- Wright J.R. (2003) Pulmonary surfactant: a front line of lung host defense. *Journal of Clinical Investigation* 111, 1453–1455.

PROCEDURA OZNACZANIA WPLYWU NANOCZĄSTEK NA WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNIOWE MONOWARSTWY GŁÓWNEGO SKŁADNIKA SURFAKTANTU PŁUCNEGO W UKŁADZIE WAGI LANGMUIRA-WILHELMY'EGO

1. Zakres metody

Metodę podaną w niniejszej procedurze wykorzystuje się do badania zmian właściwości powierzchniowych monowarstwy głównego składnika surfaktantu płucnego – dipalmitoylofosfatydylocholino (DPPC) pod wpływem cząstek nanoprószków stosowanych na stanowiskach pracy. Badanie przeprowadza się w układzie wagi Langmuira-Wilhelmy'ego.

2. Zasada metody

Badania polegają na wytworzeniu monowarstwy DPPC na powierzchni fazy ciekłej przez naniesienie roztworu chloroformowego DPPC i odparowanie rozpuszczalnika. Powstałą w ten sposób monowarstwę (tj. warstwę o grubości jednej cząsteczki fosfolipidu) poddaje się kompresji w stałej temperaturze z zadaną szybkością w celu wyznaczenia chwilowych wartości ciśnienia powierzchniowego. Analiza przebiegu izotermi kompresji monowarstwy DPPC utworzonej na powierzchni czystej fazy ciekłej, tj. bez dodatku badanych nanocząstek, oraz izoterm kompresji monowarstwy DPPC utworzonej na powierzchni zawiesin o różnych stężeniach nanocząstek umożliwia ocenę wpływu nanocząstek na właściwości powierzchniowe monowarstwy DPPC.

3. Wytyczne ogólne

3.1. Przechowywanie preparatu DPPC

Fiolkę z preparatem DPPC przechowywać w temperaturze około -20 °C.

3.2. Przechowywanie roztworu chloroformowego DPPC

Roztwór chloroformowy DPPC przechowywać w szczelnym naczyniu w zakresie temperatury 2 ÷ 8 °C.

4. Materiały

4.1. Preparat DPPC

Stosować L- α -dipalmitoylofosfatydylocholinę (DPPC) o czystości 99-procentowej i masie molowej 734,1 g/mol.

4.2. Chloroform

Stosować chloroform cz.d.a.

4.3. Roztwór chlorku sodu

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

4.4. Etanol

Stosować alkohol etylowy 96-procentowy cz.d.a.

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 płuczki ultradźwiękowe umożliwiającą sonikację w ustawionym czasie.

5.3. Pompka wodna

Stosować pompkę wodną zakończoną mikrossawką umożliwiającą odsysanie zanieczyszczeń z powierzchni fazy ciekłej oraz pozostałości cieczy z powierzchni korytka.

5.4. Waga Langmuira-Wilhelmy'ego

Stosować wagę Langmuira-Wilhelmy'ego umożliwiającą termostatowanie próbki w temperaturze 37 °C, wytworzenie monowarstwy DPPC na powierzchni fazy ciekłej i przeprowadzenie jej kompresji przy zadanej szybkości deformacji powierzchni w zakresie $0,625 \div 2,5 \text{ cm}^2/\text{s}$.

6. Procedury przygotowywania roztworów i zawiesin

6.1. Roztwór DPPC

W badaniach stosować chloroformowy roztwór DPPC o stężeniu 1 mg/ml przechowywany w szklanym naczyniu zamykanym nakrętką z uszczelką silikonową. Nakrętka powinna być wyposażona w zawór umożliwiający pobieranie roztworu bez jej odkręcania. Naczynko z roz-

tworem DPPC umieścić w lodówce w temperaturze 2 ± 8 °C.

6.2. Zawiesiny nanocząstek

Stosować zawiesiny nanocząstek w soli fizjologicznej o stężeniach: 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 i 1 mg/ml poddane uprzedniej sonikacji w czasie 5 min.

7. Przygotowanie układu wagi Langmuira-Wilhelmy'ego

Co najmniej 0,5 h przed planowanymi badaniami uruchomić łaźnię wodną i ustawić temperaturę termostatu na 37 °C. Przed przystąpieniem do pomiaru korytka oraz bariereki urządzenia dokładnie przemyć etanolem. Pozostałości etanolu zebrać z powierzchni korytka mikrossawką podłączoną do pompki wodnej, a następnie opłukać czystą wodą w celu zapewnienia czystości układu, niezbędnej do prawidłowego przeprowadzenia doświadczeń. Płytkę Wilhelmy'ego wyjąć pęsetą z naczynia z etanolem, opalić w płomieniu palnika gazowego i przemyć wodą. Następnie podwiesić na haczyku połączonym z czujnikiem siły, tak aby znajdowała się ona w centralnej części korytka i była zanurzona w cieczy do około 1/3 swojej wysokości. Wszystkie czynności związane z obsługą wagi Langmuira-Wilhelmy'ego należy wykonywać w rękawicach jednorazowych.

8. Przeprowadzenie pomiarów

Napełnić korytka wagi Langmuira-Wilhelmy'ego solą fizjologiczną, tak aby powierzchnia menisku cieczy znajdowała się około 1 mm powyżej powierzchni brzegu korytka. Po upływie około 15 min uruchomić przesuwanie barierki w stronę płytki, ścierając zanieczyszczenia z powierzchni cieczy. Zanieczyszczenia te następnie odessać mikrossawką podłączoną do pompki wodnej. Utworzyć monowarstwę DPPC na powierzchni fazy ciekłej przez ostrożne naniesienie strzykawką Hamiltona 15 μ l chloroformowego roztworu DPPC (wg punktu 6.1.) na powierzchnię soli fizjologicznej. Nie zanurzać igły pod powierzchnię cieczy. Krople roztworu DPPC umieszczać równomiernie w pobliżu płytki Wilhelmy'ego. Krople dozować z małej wysokości, aby nie spowodować ich „zatopienia” w fazie ciekłej. Układ pozostawić na 10 min do odparowania chloroformu. Po tym czasie urucho-

mić przesuw barierki z zadaną szybkością, rozpoczynając w ten sposób kompresję powierzchni monowarstwy i pomiar ciśnienia powierzchniowego. Rejestrować wartości ciśnienia powierzchniowego π [(mN)/m] w funkcji powierzchni międzyfazowej A [\AA^2 /cząsteczka]. Pomiarów wykonać dla trzech próbek czystej fazy ciekłej stanowiącej układ odniesienia.

W celu określenia wpływu badanych nanocząstek na właściwości powierzchniowe monowarstwy DPPC, korytka wagi napełnić wymieszaną dokładnie zawiesiną nanocząstek (wg punktu 6.2.) w podany wcześniej sposób. Następnie na powierzchni zawiesiny wytworzyć monowarstwę DPPC. Pomiarów przeprowadzić dla trzech próbek zawiesiny o danym stężeniu nanocząstek.

9. Opracowanie wyników pomiarów

W celu oceny właściwości powierzchniowych monowarstwy głównego składnika surfaktantu płucnego (DPPC) wyznaczyć przebieg izotermy kompresji, który jest określony jako:

$$\pi = f(A),$$

gdzie:

π – ciśnienie powierzchniowe, (mN)/m,
 A – powierzchnia międzyfazowa w \AA^2 przypadająca na jedną cząsteczkę DPPC, \AA^2 /cząsteczka.

Następnie na podstawie przebiegu krzywej izotermy kompresji wyznaczyć zależność $\kappa(\pi)$:

$$\kappa = -\frac{1}{A} \frac{dA}{d\pi},$$

gdzie:

κ – ściśliwość powierzchni ciecz-gaz zawierającej DPPC, m/N.

Dla każdej izotermy kompresji wyznaczyć minimalną wartość ściśliwości powierzchni κ_{\min} (m/N) uzyskaną podczas kompresji monowarstwy DPPC

$$\kappa_{\min} = \min\{\kappa(\pi)\}.$$

Średnią wartość minimalnej ściśliwości powierzchni dla każdego układu obliczyć jako średnią arytmetyczną z trzech wartości minimalnej ściśliwości powierzchni uzyskanych w poszczególnych pomiarach.

Ponadto dla każdej izotermy kompresji wyznaczyć maksymalną wartość ściśliwości powierzchni κ_{\max} (m/N) na podstawie zależności:

$$\kappa_{\max} = \max \{ \kappa(\pi) \}.$$

Średnią wartość maksymalnej ściśliwości powierzchni dla każdego układu obliczyć jako

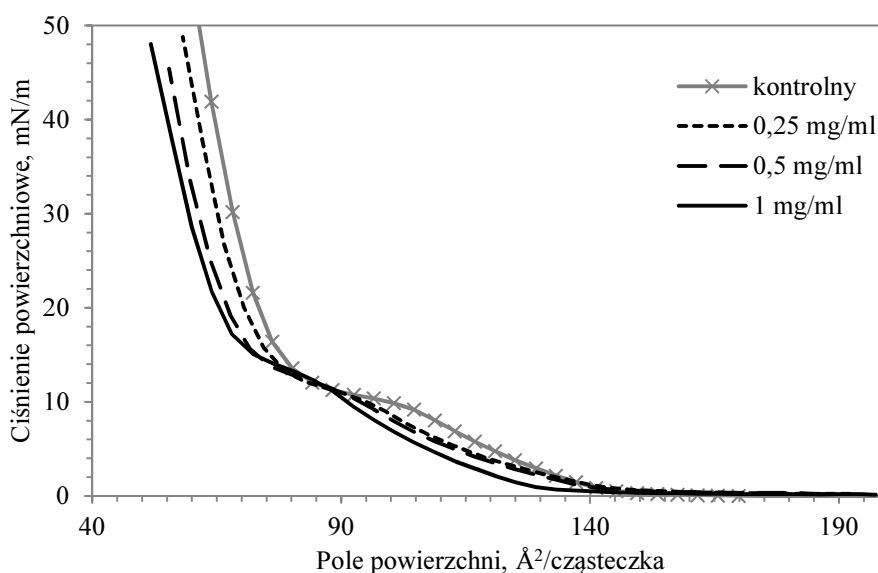
średnią arytmetyczną z trzech wartości maksymalnej ściśliwości powierzchni uzyskanych w poszczególnych pomiarach.

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

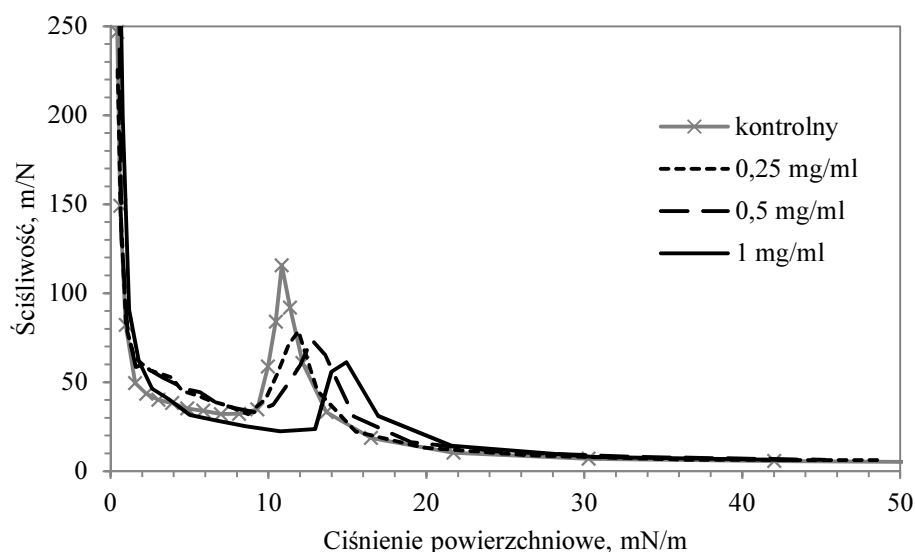
WYNIKI

Poniżej przedstawiono przykładowe wyniki badania wpływu nanocząstek glinokrzemianów na właściwości powierzchniowe monowarstwy głównego składnika surfaktantu płucnego (DPPC) uzyskane z zastosowaniem prezentowanej metody. Na rysunku 5. przedstawiono izotermy kompresji monowarstwy DPPC utworzonej na powierzchni

fazy ciekłej zawierającej nanocząstki haloizytu o stężeniach: 0,25; 0,5 i 1 mg/ml. Na rysunku 6. przedstawiono odpowiednie krzywe ściśliwości. Faza ciekła w pomiarze kontrolnym nie zawierała badanych nanocząstek. Badania przeprowadzono przy szybkości kompresji wynoszącej $75 \text{ cm}^2/\text{min}$.



Rys. 5. Izotermy kompresji monowarstwy DPPC utworzonej na powierzchni fazy ciekłej zawierającej nanocząstki haloizytu, wyznaczone przy szybkości kompresji $75 \text{ cm}^2/\text{min}$



Rys. 6. Krzywe ścisłości monowarstwy DPPC utworzonej na powierzchni fazy ciekłej zawierającej nanocząstki haloizytu HN, przy szybkości kompresji $75 \text{ cm}^2/\text{min}$

Stwierdzono, że obecność nanocząstek haloizytu ma wpływ na zmianę właściwości powierzchniowych monowarstwy głównego składnika surfaktantu płucnego (DPPC). Powodują one zmniejszenie aktywności DPPC na powierzchni międzyfazowej przejawiające się zmniejszeniem wartości ciśnienia powierzchniowego w stosunku do wartości kontrolnych. Jest to prawdopodobnie spowodowane: adsorpcją cząsteczek DPPC na powierzchni nanocząstek haloizytu, przemieszczeniem fosfolipidu w głąb objętości fazy ciekłej i w rezultacie zmniejszeniem liczby cząsteczek DPPC pozostających na powierzchni. Zjawisko to nasila się wraz ze wzrostem stężenia nanocząstek haloizytu w układzie.

Należy podkreślić, że przy interpretacji wyników badania wpływu nanocząstek na właściwości

powierzchniowe monowarstwy głównego składnika surfaktantu płucnego (DPPC) w układzie wagi Langmuira-Wilhelmy'ego niezwykle istotne jest uwzględnienie charakterystyki fizykochemicznej badanych nanocząstek. W wyjaśnieniu przyczyn zmian zachowań monowarstwy w obecności nanocząstek glinokrzemianów brano pod uwagę wiele czynników, w tym m.in. skład chemiczny, morfologię badanych nanocząstek (określoną przy wykorzystaniu skaningowego mikroskopu elektronowego), powierzchnię właściwą (określoną metodą BET), wielkość cząstek (wyznaczoną metodami DLS oraz NTA). Ten aspekt został szerzej przedstawiony w artykule opublikowanym w czasopiśmie „Inhalation Toxicology” (Kondej, Sosnowski 2013).