



Zastosowania perfluorozwiązków jako ciekłych nośników gazów oddechowych w medycynie i biotechnologii

Maciej Pilarek¹, Krzysztof W. Szewczyk²

¹Międzywydziałowe Centrum Biotechnologii, Politechnika Warszawska, Warszawa

²Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Perfluorochemicals as liquid vectors of respiratory gases used in medicine and biotechnology

Summary

Perfluorochemicals (fluorocarbons, PFCs) are the ones possible to use oxygen vector in biomedical sciences. Their structure, chemical and physical properties are fully described. The use of PFCs in medicine and biotechnology is presented. Possible areas of application of perfluorochemicals in biochemical engineering are discussed. Pure liquid or emulsified PFCs are used in the bioreactor cultures of microbial, plant or animal cells to improve the oxygen (or carbon dioxide) delivery with simultaneous reduction of hydrodynamic shear stress.

Key words:

perfluorochemicals, fluorocarbons, oxygen vectors, liquid oxygenation, *in vitro* cell cultures.

Adres do korespondencji

Maciej Pilarek,
Międzywydziałowe
Centrum Biotechnologii,
Politechnika Warszawska,
ul. Waryńskiego 1,
00-645 Warszawa;
e-mail:
pilarek@mcb.pw.edu.pl

biotechnologia

2 (69) 125–150 2005

1. Wprowadzenie

Perfluorozwiązki (perfluoropochodne węglowodorów, perfluoroalkany, perfluorokarbony, związki perfluorowane; *PFC*, *perfluorochemicals*) to pochodne alifatycznych, cyklicznych i policyklicznych węglowodorów, w których większość lub wszystkie atomy wodoru zostały zastąpione atomami fluoru [1]. Związki perfluorowane są przedmiotem rosnącego od kilkunastu lat zain-

teresowania z uwagi na szereg wykazywanych przez nie specyficznych właściwości fizykochemicznych. Szczególnie interesujące są: wysoka rozpuszczalność gazów oddechowych, czyli tlenu i dwutlenku węgla oraz chemiczna i biologiczna inertność. Te cechy umożliwiają stosowanie perfluorozwiązków w medycynie oraz w biotechnologii jako ciekłych nośników tlenu (względnie dwutlenku węgla). Brak mieszalności z płynami fizjologicznymi i ciekłymi pożywkami ułatwia pracę z tymi substancjami, umożliwia ich regenerację oraz wielokrotne użycie. Wszystko to sprawia, że perfluorozwiązki są interesującym medium pośredniczącym w wymianie gazowej zachodzącej w płucach, a także ciekłym nośnikiem tlenu, który umożliwia usprawnienie hodowli drobnoustrojów oraz komórek roślinnych i zwierzęcych w bioreaktorach.

Uznawane za tradycyjne zastosowania związków perfluorowanych dotyczą ich wykorzystania w różnych gałęziach przemysłu, na przykład w przetwórstwie polimerów, przemyśle tekstylnym, a także chemicznym i związane są z produkcją środków gaśniczych, odzyskiem olejów oraz produkcją specjalistycznych środków czyszczących. Interesującym zastosowaniem ciekłych perfluoroalkanów jest użycie ich jako środowiska reakcji dwufazowych oraz procesów prowadzonych w ciekłym bądź nadkrytycznym dwutlenku węgla [2].

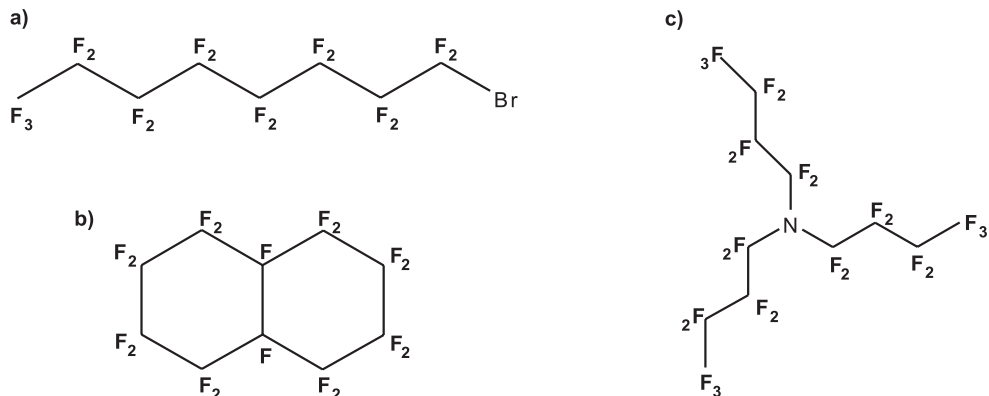
W artykule omówiono budowę oraz fizykochemiczne właściwości perfluorozwiązków. Przedstawiono ich dotychczasowe zastosowania w medycynie i biotechnologii. Przedyskutowano także możliwe kierunki rozwoju biotechnologicznych aplikacji związków perfluorowanych.

2. Budowa i właściwości fizykochemiczne perfluorozwiązków

Fluor charakteryzuje się najwyższą elektroujemnością spośród wszystkich znanych pierwiastków chemicznych, a jego atomy wykazują bardzo niską polaryzację, ponadto jest najsilniejszym znanym utleniaczem [3]. Zastąpienie w cząsteczkach węglowodorów atomów wodoru atomami fluoru znacząco zmienia właściwości fizykochemiczne związku. Na rysunku 1 przedstawiono struktury chemiczne przykładowych cząsteczek perfluorozwiązków. Ogólny sumaryczny wzór perfluoroalkanów całkowicie wysyconych fluorem ma postać C_nF_{2n+2} .

Po raz pierwszy, perfluorozwiązki zostały zsyntetyzowane podczas II wojny światowej w ramach badań nad projektem Manhattan. Poszukiwano wówczas materiałów do przechowywania bardzo reaktywnego, sześćofluorku uranu (UF_6), używanego do produkcji bomby atomowej i okazało się, że perfluoropochodne węglowodory znakomicie się nadają do tego celu [1].

Atom fluoru jest prawie 20 razy cięższy od atomu wodoru. Konsekwencją podstawienia szkieletu węglowego w cząsteczkach perfluoroalkanów atomami fluoru jest cały szereg specyficznych i bardzo interesujących właściwości fizykochemicznych wykazywanych przez omawianą grupę związków. W porównaniu z węglowodorami ich perfluoropochodne wykazują się znacznie większą sztywnością łańcu-



Rys. 1. Struktury chemiczne przykładowych cząsteczek perfluorozwiązków: a) bromku perfluorooktylu (PFC alifatyczny), b) perfluorodekalina (PFC cykliczny) oraz c) perfluorotributyloaminy (perfluorowana pochodna aminy organicznej).

cha. Wynika to z większej objętości grup CF₂ (38 Å³) i CF₃ (92 Å³) aniżeli odpowiadających im ugrupowaniom CH₂ (27 Å³) i CH₃ (54 Å³) [4]. Gęstość perfluorozwiązków jest około dwa razy większa od gęstości wody. Wykazują znacznie większą hydrofobowość niż węglowodory, z których zostały zsyntetyzowane, a jednocześnie, co bardzo ciekawe i do tej pory uważane za sprzeczność, lipofobowość [4].

Energia wiązania węgiel-fluor wzrasta wraz z ilością podstawników fluorkowych i w terminalnych grupach CF₃ osiąga ona wartość 531 kJ/mol [4]. Efektem wysokiej wartości energii wiązań węgiel-fluor, wynoszącej około 485 kJ/mol (czyli o 75 kJ/mol większej niż wiązanie węgiel-wodór) w połączeniu z efektem sterycznym, jaki nadają cząsteczki atomy fluoru podstawiające szkielet węglowy jest chemiczna i termiczna stabilność związków perfluorowanych oraz wyjątkowo słabe wiązania van der Waalsa między sąsiednimi cząsteczkami [1,3,5]. O biologicznej nieaktywności perfluoropochodnych węglowodorów, wynikającej z ich inertności w reakcjach chemicznych, świadczy to, że do tej pory nie wyizolowano żadnego mikroorganizmu wykorzystującego perfluorozwiązki jako źródło węgla, a także to, że nie stwierdzono by jakiegokolwiek rozkład perfluoroalkanów zachodzący na drodze enzymatycznej [3]. Omawiana grupa związków nie powinna być zatem mylona z bardzo lotnymi, wysoce reaktywnymi i bardzo szkodliwymi dla środowiska naturalnego chlorofluorowęglowodarami, które są uważane za przyczynę niszczenia ziemskiej, stratosferycznej powłoki ozonowej. Jedynym wyjątkiem spośród perfluorozwiązków jest bardzo lotny perfluoroizobutylen ((CF₃)₂CF=CF₂), który jest bardzo reaktywny i toksyczny.

Chemiczna i biologiczna obojętność związków perfluorowanych jest ważna dla ich wykorzystania w medycynie i biotechnologii. Cecha ta może powodować także odkładanie się perfluorozwiązków w światowej ekosferze. W badaniach monitorujących stan środowiska naturalnego na świecie wykazano, że śladowe zawartości

perfluorozwiązków zostały stwierdzone w organizmach różnych gatunków europejskich i północnoamerykańskich ryb, ptaków i morskich ssaków [6].

Wyjątkowo słabe oddziaływania van der Waalsa obserwowane pomiędzy cząsteczkami PFC są odpowiedzialne za inne charakterystyczne cechy perfluorozwiązków, takie jak: bardzo niskie napięcie powierzchniowe, mała lepkość, niska stała dielektryczna oraz ich wysoka ściśliwość [4].

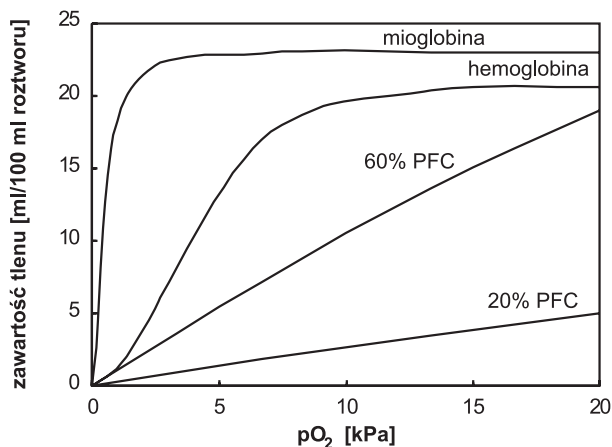
Bardzo interesującą cechą związków perfluorowanych jest zdolność do rozpuszczania dużych objętości gazów oddechowych (tleny i dwutlenku węgla) oraz innych niepolarnych gazów. Wykazano, że rozpuszczalność gazów w perfluoropochodnych węglowodorów wzrasta zgodnie z następującym szeregiem: $\text{CO}_2 \gg \text{O}_2 > \text{CO} > \text{N}_2$ [1,7]. Rozpuszczalność dwutlenku węgla sięgać może ponad 200 ml CO_2 w 100 ml PFC, natomiast typowa wartość rozpuszczalności tlenu wynosi około 45 ml O_2 na 100 ml związku perfluorowanego [7]. W tabeli 1 przedstawiono wartości rozpuszczalności gazów oddechowych w wybranych perfluoroalkanach – dla porównania podano analogiczne wartości rozpuszczalności dla wody. Tlen jest bardziej efektywnie rozpuszczany w alifatycznych PFC aniżeli w przypadku tych o cyklicznej budowie łańcucha węglowego. Przyjmuje się, że rozpuszczalność tlenu w perfluorozwiązkach jest odwrotnie proporcjonalna do ich masy molowej i związana jest z liczbą obecnych w cząsteczce atomów fluoru [7].

Tabela 1

Wartości rozpuszczalności tlenu i dwutlenku węgla w przykładowych perfluorozwiązkach [5]

Ciecz	Rozpuszczalność gazu ($T = 20^\circ\text{C}$, $p = 101,3 \text{ kPa}$) [mmol dm^{-3}]	
	O_2	CO_2
woda	2,2	57
perfluorotributyłamina	35,2	123
perfluorodekalina	35,5	125
bis(perfluoroheksylo)eten	37,9	159
perfluorotripropylamina	39,6	146
bromek perfluorooktylu	44,0	185
bis(perfluorobutylo)eten	44,0	203

Rozpuszczalność gazów w perfluoroalkanach podlega prawu Henry'ego i wzrasta wprost proporcjonalnie do jego ciśnienia cząstkowego [4,7]. Naturalnie występujące nośniki gazów oddechowych: hemoglobina (obecna we krwi), która posiada zdolność przenoszenia O_2 , CO_2 i H^+ oraz mioglobina, dzięki której zachodzi transport tlenu w mięśniach, wykazują zależność nieliniową [8]. Na rysunku 2 przedsta-



Rys. 2. Krzywe rozpuszczalności tlenu w funkcji jego stężenia cząstkowego (pO_2) jako ilustracja powinowactwa mioglobiny, hemoglobiny oraz emulsji PFC (20 i 60%) do tlenu (7,8).

wiono porównanie powinowactwa do tlenu wykazywane przez nośniki tego gazu obecne w tkankach zwierząt oraz syntetycznie otrzymane emulsje perfluorozwiązków. Hemoglobina i mioglobina ulegają wysyceniu tlenem w podanym zakresie stężeń cząstkowych gazu. Natomiast krzywa rozpuszczalności O_2 w emulsjach PFC (20 i 60%), zgodnie z prawem Henry'ego, ma charakter prostoliniowy.

Konsekwencją liniowej zależności pomiędzy rozpuszczalnością gazu w związkach perfluorowanych a ciśnieniem cząstkowym gazu, a także średnio 20-krotnie większej rozpuszczalności w nich tlenu niż w plazmie krwi jest to, że pod ciśnieniem atmosferycznym w perfluorozwiązkach rozpuszcza się około trzykrotnie więcej tlenu obecnego w powietrzu atmosferycznym (jego zawartość wynosi około 21%) niż w plazmie [9].

Różnice w przedstawionej na rysunku 2 zależności wysycenia tlenem hemoglobiny i PFC od ciśnienia cząstkowego O_2 (pO_2) wynikają z zupełnie różnych mechanizmów rozpuszczania w nich tlenu. Cząsteczka hemoglobiny wiąże tlen na drodze powstawania chemicznych wiązań pomiędzy atomami tlenu i jednostką niebiałkową hemoglobiny – grupą hemową. Atom żelaza występujący w centrum ugrupowania protoporfiryny związany jest z czterema atomami azotu. Może on jednak tworzyć dwa dodatkowe wiązania. Warunkiem koniecznym do wytworzenia wiązań z tlenem jest jednak występowanie protoporfirynowego atomu żelaza w postaci jonu żelazowego (Fe^{2+}) [7]. Zupełnie inny mechanizm rozpuszczania tlenu obserwuje się w przypadku perfluorozwiązków. Jest to proces bierny chemicznie, ponieważ zachodzi bez potrzeby wytworzenia wiązań. Cząsteczki tlenu wypełniają bowiem przestrzenie powstałe na skutek ułożenia molekuł ciekłych PFC [9,10].

3. Aplikacje medyczne

Właściwości fizykochemiczne perfluoroalkanów determinują ich brak reaktywności oraz brak mieszalności ze składnikami wszystkich płynów ustrojowych. Proces dopuszczania PFC do użytku terapeutycznego został już w niektórych przypadkach zakończony lub jest w końcowej fazie badań klinicznych. Dotyczy to na przykład stosowania związków perfluorowanych jako cieczy umożliwiających czasowe wspomaganie procesu oddychania podczas sztucznej wentylacji płuc, w tym także noworodków (III faza badań klinicznych w Europie i USA), stosowania PFC w postaci emulsji jako zamiennika krwi w tkankach zagrożonych niedotlenieniem (III faza badań klinicznych w Europie i USA), czy użycia ich jako medium służącego do przechowywania organów przeznaczonych do transplantacji (dopuszczone do użytku w Europie i USA) [4,10]. Medyczne zastosowania perfluorozwiązków w postaci czystych cieczy lub w formie wodnych emulsji przedstawione zostały w tabeli 2.

Tabela 2

Przykłady zastosowań perfluorozwiązków do celów medycznych [10]

Zastosowanie	Postać stosowanego PFC (C – ciecz, E – emulsja)
sztuczna wentylacja	C
zamienniki krwi	E
specyficzne podawanie leków	C / E
diagnostyka medyczna	C*
przechowywanie organów do transplantacji	E
chirurgia oka	C

* obecnie do tego celu stosuje się PFC, które w temperaturze ciała ludzkiego (około 37°C) występują w postaci gazowej, np. perfluoropropyl (C_3F_8), perfluoropentyl (C_5F_{12})

W trakcie badań przeprowadzanych przez ostatnie dwadzieścia lat nie stwierdzono, by czyste perfluorozwiązki o masach cząsteczkowych z zakresu od 460 do 520 g/mol były toksyczne, rakotwórcze lub mutagenne, bądź wywoływały teratogenne efekty w organizmach żywych. Obecność w organizmie PFC nie powoduje także reakcji immunologicznej [4]. Iniekcyjne podanie perfluoropochodnej węglowodoru do ustroju wywołuje krótkotrwale zwiększenie masy wątroby i śledziony, która to reakcja związana jest z mechanizmem wchłaniania kropeł PFC przez fagocyty (głównie wątroby i śledziony) skąd następnie cząsteczki perfluoroalkanów dyfundują z powrotem do krwi, z którą przenoszone są wraz z lipidami wchodzącymi w skład plazmy do płuc, gdzie są wydychane w postaci gazowej (par). Wyniki badań przeprowadzanych na zwierzętach pokazują, że podczas wydalania perfluorozwiązków nie ob-

serwuje się fizjologicznych zmian w płucach czy zmian właściwości fizycznych naturalnego surfaktantu płucnego [10].

3.1. Sztuczna wentylacja i wspomaganie oddychania

W roku 1966 Clark i Gollan wykazali, że mysz swobodnie „oddycha” po zanurzeniu jej na kilka godzin w nasyconym tlenem, czystym fluorobutyloctetrawodorofuranie (związek ten, o handlowej nazwie FX-80, produkowany jest przez 3M Company, USA). Po wyjęciu ze zbiornika z PFC mysz ponownie zaczynała oddychać powietrzem atmosferycznym. Eksperyment ten zapoczątkował rozwój nowoczesnych metod sztucznej wentylacji cieczą (*liquid ventilation*) opartej na wykorzystaniu w tym celu perfluoropochodnych węglowodorów [1,11,12].

W porównaniu z tradycyjną sztuczną wentylacją, podczas której wykorzystuje się powietrze atmosferyczne wzbogacone dodatkiem czystego tlenu, sztuczna wentylacja cieczą posiada szereg zalet. Wyeliminowana zostaje mianowicie powierzchnia międzycząsteczkowa gaz-ciecz, co redukuje napięcie powierzchniowe w pęcherzykach płucnych. W ten sposób zwiększona zostaje wydajność płuc w dostarczaniu tlenu do naczyń włosowatych u pacjentów z ostrą niewydolnością oddechową [4,13]. W przypadkach schorzeń, które do tej pory kończyły się zgonem wielu pacjentów, z powodzeniem stosowany jest na przykład bromek perfluorooktylu (perflubron, patrz rys. 1) – alifatyczna perfluoropochodna oktanu, podstawiona dodatkowo atomem bromu przy terminalnym atomie węgla, produkowana przez Alliance Pharmaceutical Corporation (San Diego, USA). Ze względu na wykazywaną niską wartość napięcia powierzchniowego (0,015-0,019 N/m), perflubron bardzo dobrze penetruje i wypełnia przestrzenie oskrzelików [11]. Stosując perfluorozwiązek do sztucznej (ciekłej) wentylacji płuc zaobserwowano intensyfikację wymiany gazowej nawet w tych rejonach płuc, które charakteryzowały się niewydolnością ze względu na niewystarczającą ilość surfaktantu płucnego wyścielającego ściany oskrzelików i pęcherzyków płucnych [14]. Ponadto u pacjentów, u których wspomagano oddychanie, stosując w tym celu perfluoroalkan, zaobserwowano spadek zachorowalności na następcze zapalenie płuc [15], co, jak się wydaje, jest kolejną oczywistą korzyścią wynikającą z użycia PFC do sztucznej wentylacji płuc.

Na podstawie uzyskanych wyników z przeprowadzonych doświadczeń na zwierzętach wykazano, że podczas sztucznej wentylacji perfluorozwiązkami, można jednocześnie podawać leki. Pozytywne wyniki uzyskano podczas prób podawania owcom leków rozszerzających naczynia krwionośne [14]. Okazało się także, że podawanie penicyliny szczurom podczas ich sztucznej wentylacji cieczą jest efektywną terapią bakteryjnego zapalenia płuc. W podobny sposób mogłyby być podawane także leki oskrzelowe, egzogenne surfaktanty, antyutleniające, steroidy czy nawet środki chemoterapeutyczne w terapii nowotworów układu oddechowego [4].

3.2. Emulsje perfluorozwiązków jako zamienniki krwi

Najbardziej intensywnie rozwijaną i badaną aplikacją medyczną perfluorozwiązków jest ich wykorzystanie jako czasowych zamienników krwi (*temporary blood substitute*) podczas zabiegów chirurgicznych. Oczekiwany efektem wprowadzenia PFC do układu krwionośnego jest wzrost rozpuszczalności tlenu w plazmie krwi [4]. W pierwszych doświadczeniach przeprowadzonych przez Geyera w 1968 r. wykazano, że drobnokropelkowa emulsja perfluorozwiązku może być zastosowana jako zamiennik krwi szczura [16].

Typowa fizjologiczna różnica ciśnień cząstkowych tlenu (pO_2) występująca pomiędzy płucami a dotlenianymi tkankami powoduje, że hemoglobina zawarta w 100 ml krwi zdolna jest do związania i dostarczenia do tkanek około 5 ml O_2 natomiast 100 ml 60% emulsji perflubronu wiąże tylko 2 ml tlenu. W przeciwieństwie do hemoglobiny, rozpuszczalność gazów w perfluorozwiązkach podlega prawu Henry'ego, zaś stężenie tlenu w powietrzu atmosferycznym wynosi około 21%. Zwiększając stężenie O_2 w podawanej do płuc mieszance gazów do ponad 90% uzyskuje się wzrost wydajności sztucznej wentylacji perfluorozwiązkiem i zapewnia przeniesienie 10 ml tlenu przez 100 ml 60% emulsji perflubronu [10]. Przykład ten wyjaśnia, dlaczego emulsje perfluoroalkanów są z powodzeniem stosowane jako zamienniki krwi, w przypadku gdy konieczna jest intensyfikacja transportu tlenu do tkanek pacjenta. Przenoszenie tlenu do krwi, tkanek oraz komórek przez perfluorozwiązki zachodzi dzięki różnicy stężeń tlenu istniejącej pomiędzy komórkami a natlenioną fazą perfluorowaną. Transport masy zależy od siły napędowej procesu, którą w tym przypadku jest wspomniana różnica stężeń tlenu, natomiast nie zależy od różnic w rozpuszczalności gazu w fazie ciekłej.

Perfluorozwiązki nie mieszają się z układami wodnymi, a do takich zaliczyć należy krew. Mogą zostać jednakże podane dożylnie w postaci wodnych emulsji. Proces wytwarzania emulsji PFC jest skomplikowany technicznie ze względu na wymaganą bardzo małą średnicę kropeł, zwykle mniejszej niż 0,2 μm [17]. Wyróżnia się dwie generacje emulsji PFC stosowanych w omawianym celu (tab. 3).

Tabela 3

Emulsje perfluorozwiązków pierwszej i drugiej generacji wykorzystywane jako zamienniki krwi [10]

Nazwa	Składnik PFC	Kraj pochodzenia	Próby kliniczne	Dostępność
1	2	3	4	5
emulsje pierwszej generacji				
Fluosol®	perfluorodekalina, perfluorotripropylamina	Japonia, USA	tak	wycofany
Emulsion N° II	perfluorodekalina, perfluorotripropylamina	Chiny	tak	dostępny
Perforan	perfluorodekalina, perfluorometylocyklopiperidyna	Rosja	tak	dostępny
Oxypherol®	perfluorotributylamina	Japonia	nie	wycofany

1	2	3	4	5
emulsje drugiej generacji				
Oxygent®	perflubron, bromek perfluorodecyłu	USA	tak	dostępny
Oncosol®	perfluorofenantren	USA	tak	dostępny
Oxyfluor®	perfluorodichlorooctan	USA	tak	dostępny
Fluxon®	perfluorodekalina, perfluorodimorfolinopropan	UE	nie	dostępny

Pierwszą emulsją PFC dopuszczoną od roku 1990 do klinicznego użycia w Europie i w Stanach Zjednoczonych był preparat o nazwie Fluosol®. Jako składnik aktywnie wiążący tlen, preparat ten zawierał mieszaninę dwóch perfluorozwiązków: perfluorodekalinę (14%) i perfluorotri-*n*-propyloaminę (6%). Jako emulgatorów użyto: syntetyczny surfaktant Pluronic® F-68, fosfolipidy żółtka jaja kurzego oraz oleinian potasu [10,18,19]. Fluosol® stosowano jako środek reanimujący w bardzo zaawansowanych przypadkach anemii. Ze względu na niską rozpuszczalność tlenu w emulsji, nawet duże jej dawki nie gwarantowały jednak pozytywnego efektu terapeutycznego. W połowie lat osiemdziesiątych zaprzestano stosowania emulsji PFC pierwszej generacji [18]. Głównymi czynnikami ograniczającymi ich zastosowania były: niestabilność w temperaturze pokojowej (wymagały przechowywania w temperaturze poniżej -20°C), niska skuteczność przenoszenia tlenu oraz wywoływanie reakcji immunologicznej organizmu przez syntetyczny surfaktant [10,19].

Producenci emulsji perfluorozwiązków drugiej generacji postawili sobie za zadanie otrzymanie produktu o znacznie większej rozpuszczalności tlenu w porównaniu do emulsji pierwszej generacji. Konieczne jednak było zachowanie rozsądnej lepkości produktu, umożliwiającej jego zastosowanie w układzie krwionośnym oraz przeciwdziałanie efektowi tzw. „dojrzenia Ostwalda” (*Ostwald ripening*). Z termodynamicznego punktu widzenia emulsje są bowiem układami niestabilnymi. Powstałe w procesie ich wytwarzania pierwotne krople perfluorozwiązku zawieszony w fazie ciągłej łączą się i powiększają się na skutek koalescencji. Okazuje się, że proces ten może zostać zahamowany dzięki dodatkowi do emulsji niewielkich ilości wysokocząsteczkowych perfluorowanych olejów o wysokiej temperaturze wrzenia, które stabilizują strukturę emulsji [19-21]. Podstawowymi składnikami współczesnych emulsji PFC są: perflubron (C₈F₁₇Br) o masie molowej 500 g/mol oraz perfluorodekalina (C₁₀F₁₈) o masie molowej 462 g/mol. Obecne technologie produkcji tych perfluorozwiązków pozwalają na otrzymywanie produktów o bardzo wysokim stopniu czystości, co zapobiega fizjologicznym efektom ubocznym obserwowanym po wprowadzeniu *in vivo* do ustroju nie w pełni wysyconych atomami fluoru węglowodorów. Istotną cechą emulsji PFC drugiej generacji jest możliwość ich sterylizacji w autoklawie. Warunki sterylizacji nie powodują zmiany ich struktury ani utraty funkcjonalności [10,19].

Perflubron jest głównym składnikiem komercyjnie dostępnej emulsji o nazwie Oxygent™. Perfluorozwiązek ten jest w prosty i łagodny sposób wydalany z organi-

zmu, w czym pomaga mu obecność atomu bromu przy jednym z terminalnych atomów węgla. Nadaje on cząsteczce charakter lipofilowy, co ułatwia przenikanie przez błony komórkowe. Składnikiem zapobiegającym koalescencji kropeł PFC jest homolog perflubronu – bromek perfluorodecyłu ($C_{10}F_{21}Br$). W Oxygent™ jako emulgator zastosowano fosfolipidy żółtka jajka kurzego (3,6%). Niewielki dodatek α - tokoferolu (do 0,2%) zapobiegał ich utlenianiu. Okres przydatności emulsji do użycia, przy przechowywaniu jej w temperaturze 4-6°C, wynosi ponad rok [10,20]. Półokres zatrzymania perflubronu w komórkach zwierzęcych wynosi około 4 dni.

Innym z perfluoroalkanów stosowanych jako nośnik tlenu w emulsjach PFC drugiej generacji jest perfluorodekalina – perfluorozwiązek o budowie cyklicznej. Czynnikiem emulgującym jest lecytyna (2,5%) natomiast składnikiem zapobiegającym rozwarstwianiu się emulsji jest perfluoro-1,3-dimorfolinopropan (do 1%). Emulsje perfluorodekaliny zawierają od 20 do 40% PFC i są przydatne do użycia przez jeden rok od wyprodukowania, przy przechowywaniu w temperaturze pokojowej [10]. Ich półokres zatrzymania w komórkach zwierzęcych wynosi około 7 dni.

Obiecujące wyniki przeprowadzonych do chwili obecnej badań laboratoryjnych i klinicznych zwiększają zainteresowanie perfluoroalkanami jako nośnikami tlenu w organizmie człowieka *in* oraz *ex situ*. Obserwacje stanu pacjentów, u których zastosowano emulsje PFC pokazują, bowiem bezsprzecznie, że na skutek ich użycia [10]:

- zwiększa się stężenie tlenu w plazmie krwi;
- następuje wzrost stopnia natlenienia tkanek;
- zwiększeniu ulega fizjologiczny wychwyty tlenu rozpuszczonego w emulsji przez komórki.

Problemem jest jednak stosunkowo krótki, w porównaniu z hematocytami wprowadzonymi drogą transfuzji, czas przebywania w naczyniach krwionośnych. W zależności od zastosowanego perfluorozwiązku wynosi on, bowiem od 2 do 4 godzin [22]. Znacznie ogranicza to pole zastosowania *in vivo* emulsji PFC.

3.3. Przechowywanie organów do transplantacji

Większość spośród narządów przeznaczonych do przeszczepu nadaje się do wykorzystania tylko przez kilka godzin od momentu wyizolowania ich z ciała dawcy. Na długość tego okresu wpływają warunki przechowywania transplantowanego organu oraz roztwór, w którym jest on przechowywany. Ze względu na unikatowe właściwości fizykochemiczne perfluoroalkany okazują się bardzo przydatnymi składnikami syntetycznych płynów, służących do przechowywania narządów przeznaczonych do transplantacji. Płyn w skład, których wchodziły związki perfluorowane, stosowano dotychczas w badaniach nad przechowywaniem następujących organów: mięsień sercowy, wątroba, płuca, nerki oraz mięśnie szkieletowe [18,23]. Pierwsze próby zastosowania związków perfluorowanych do natleniania wyizolowanych z ży-

wego organizmu wątroby i nerek przeprowadzono już w roku 1980, kiedy zastosowano tę procedurę przez okres od 24 do 48 godzin od wyizolowania organów z organizmu szczura [23,24].

Podczas przechowywania ludzkich serc do transplantacji stosuje się bądź obniżenie temperatury (hipotermia), bądź porażenie mięśnia sercowego (kardioplegia). Dodatek emulsji PFC do roztworu stabilizującego wyizolowany z organizmu mięsień sercowy zapewnia prawidłowe przenoszenie tlenu przez mioglobinę do komórek mięśni gładkich serca [25]. Poza zdolnością do utrzymania wysokiego natlenienia organu, emulsje perfluorozwiązków, wykazują także korzystny wpływ na zachowanie funkcjonalności serca oraz syntezę w jego mięśniu wysokoenergetycznych związków fosforanowych [25,26].

Istnieją dwa sposoby natleniania pobranego do transplantacji mięśnia sercowego: zalanie naczyń wieńcowych oraz, prostsze w wykonaniu, zanurzenie całego narządu w odpowiednim roztworze natleniającym. Pierwszy z nich, polegający na wypełnieniu naczyń wieńcowych płynem natleniającym i przetłaczaniu tego płynu przez nie, zapewnia dłuższy czas pozaustrojowego przechowywania mięśnia sercowego niż samo umieszczenie go w odpowiednim roztworze. Okazało się, że dodatek perfluorozwiązku do roztworu przetłaczanego przez naczynia wieńcowe, umożliwił wydłużenie aż do 24 godzin pozaustrojowego przechowywania serca pobranego z organizmu psa [27].

3.4. Perspektywy zastosowań PFC w medycynie

Dalszy rozwój medycznych zastosowań perfluorozwiązków, jak się wydaje, związany będzie z ich użyciem nie w postaci czystych cieczy, lecz emulsji lub innych rozproszonych układów koloidalnych. To właśnie układy typu „krople PFC w wodzie” stanowią wydajne, bezpieczne w użyciu i opłacalne narzędzie zapewniające *in vivo* dostarczanie tlenu do tkanek [4]. Zastosowanie natlenionych emulsji perfluorozwiązków być może pozwoli na ograniczenie zapotrzebowania na krew w trakcie długotrwałych zabiegów chirurgicznych. Zwłaszcza, że ich wykorzystanie jako czasowych zamienników krwi nie podlega ograniczeniu z uwagi na grupę krwi.

Opracowanie bezpiecznego i efektywnego w stosowaniu zamiennika krwi jest aktualnym celem badań. Obecnie pojawiły się nowe zagrożenia związane z przeniesieniem wirusów (np. HIV, zapalenie wątroby typu B i C), a także prionów (np. choroba Creutzfeldta-Jakoba) w preparatach krwiopochodnych. Zastosowanie syntetycznego przenośnika tlenu umożliwi wyeliminowanie ryzyka związanego z tymi czynnikami zwłaszcza, że perfluorowane, sztuczne zamienniki krwi są łatwe do sterylizacji, np. w autoklawie [28,29]. Dalsze badania w tym kierunku są ukierunkowane na poszukiwanie metody przedłużenia czasu przebywania kropeł PFC w układzie krwionośnym. Pozwoli to na stosowanie perfluorozwiązków u pacjentów wymagających długookresowego przyjmowania preparatów zapewniających prawidłowy stan natlenienia ich organów wewnętrznych i tkanek [10,22,28].

Kolejnym kierunkiem opracowywania nowych medycznych zastosowań perfluoroalkanów są sposoby bezpośredniego podawania leków podczas prowadzenia ciekłej, sztucznej wentylacji płuc. Do tego celu mogą zostać zastosowane na przykład odwrócone układy emulsyjne, w których krople wody zawieszono są w perfluorowanej fazie ciągłej. Pozwoli to na wprowadzanie, sposobem analogicznym do drogi wziewnej, farmaceutyków rozszerzających oskrzela, środków mukolitycznych czy też leków stosowanych w terapii nowotworów układu oddechowego. Wymienione przykładowe środki farmakologiczne o charakterze hydrofilowym, zawarte w kroplach wody tworzących emulsje, nie traciłyby w ten sposób nic ze swojej biologicznej aktywności. Zapewniona byłaby jednolita i powtarzalna dystrybucja tychże leków w oskrzelach oraz płucach. Innymi wariantami podawania leków lipofilowych omawianą drogą są emulsje utworzone przez krople oleju w perfluorowanym ośrodku ciągłym [4,19,30,31].

4. Aplikacje biotechnologiczne

Szybkość dostarczania tlenu do medium hodowlanego jest czynnikiem bardzo ważnym i często limitującym szybkość wzrostu we wszystkich typach bioreaktorów używanych do prowadzenia głębokiej hodowli tlenowych organizmów *Prokaryota* i *Eukaryota*. Związane jest to ze słabą rozpuszczalnością tlenu w wodzie, która jest podstawowym (naturalnym) składnikiem wszystkich pożywek. Podstawowym źródłem tlenu jest powietrze atmosferyczne. Jest ono w sposób ciągły doprowadzane do reaktora. Ograniczona rozpuszczalność tlenu w wodzie wymusza intensywne napowietrzanie i mieszanie płynu fermentacyjnego, aby zwiększyć szybkość absorpcji tlenu. Mieszanie powoduje rozbijanie pęcherzy gazu, a tym samym rozwinięcie powierzchni kontaktu fazy gazowej i ciekłej. Efektem ubocznym intensywnego napowietrzania i mieszania medium hodowlanego jest generowanie sił ścinających, które w dużej mierze odpowiedzialne są za występowanie tzw. „stresu komórkowego” polegającego na niszczącym działaniu naprężeń hydrodynamicznych na hodowane komórki. Zwłaszcza komórki zwierzęce są bardzo wrażliwe na siły wytworzone podczas: mechanicznego ocierania się i rozbijania komórek o elementy bioreaktora (mieszadło, ściany), oddziaływania na nie sił powstałych w wyniku przepływu płynu oraz rozbijania i łączenia się pęcherzyków gazu [32,33].

Jedną z proponowanych alternatywnych technik efektywnego napowietrzania środowiska wzrastającej kultury komórkowej jest zastosowanie do tego celu ciekłych nośników tlenu (*oxygen vector*). Są to związki organiczne, które wykazują się większą rozpuszczalnością tlenu niż woda. Jako przykłady wymienić można: perfluorozwiązki, płynne węglowodory nasycone (*n*-dodekan, *n*-heksadekan), czy też olej sojowy. Zaletą zastosowania związków tego typu jest obserwowane zwiększenie szybkości przenikania tlenu do komórek bez potrzeby dostarczenia dodatkowych porcji energii do medium hodowlanego [34,35]. Ze względu na chemiczną i biolo-

giczną inertność oraz silnie hydrofobowy charakter, użycie związków perfluorowanych, jak się wydaje, będzie bardzo interesującym i alternatywnym rozwiązaniem procesowym do tradycyjnych metod napowietrzania. Inne zalety PFC przemawiające za stosowaniem ich jako nośników gazów oddechowych w bioreaktorowych hodowlach komórkowych są następujące [1,5,36]:

- termostabilność, która ułatwia sterylizację perfluoroalkanów (np. w autoklawie);
- ze względu na swoją silną hydrofobowość są łatwe do odzyskania z płynu hodowlanego, co stwarza możliwość ich recyrkulacji;
- pochłaniają gazowe produkty metabolizmu komórek;
- dodatek PFC do fazy wodnej powoduje powstanie powierzchni międzyfazowej (PFC – woda), która może ułatwiać podziały komórkowe.

Szybkość dostarczania do medium hodowlanego tlenu za pomocą związków perfluorowanych jest wprost proporcjonalna do powierzchni międzyfazowej utworzonej na styku dwóch faz: wodnej pożywki oraz hydrofobowej fazy PFC. Największą powierzchnię międzyfazową zapewnia użycie emulsji perfluoroalkanów, jednak praktycznie wykluczają one możliwość regeneracji i recyrkulacji nośnika tlenu. Organiczne składniki stabilizujące emulsje mogą wchodzić w reakcje ze składnikami płynu fermentacyjnego lub zostać wykorzystane, np. jako źródło węgla, przez hodowane komórki. Innym sposobem zwiększenia powierzchni międzyfazowej jest rozbicie fazy perfluorozwiązków na drobne krople za pomocą intensywnego mieszania lub sonifikacji. Zbyt drobne rozbicie jest przyczyną wydłużenia czasu koalescencji kropelek PFC, który to efekt utrudnia regenerację fazy perfluorowanej. W bioreaktorowych aplikacjach perfluoroalkanów należy zatem poszukiwać optymalnych rozwiązań procesowych zapewniających uzyskanie dostatecznie dużej powierzchni przy jednoczesnej gwarancji uzyskania pożądanego efektu technologicznego w postaci natlenienia medium hodowlanego.

4.1. Hodowle mikroorganizmów

W zależności od warunków hodowli mikroorganizmów, podstawowym celem zastosowania w nich związków perfluorowanych jest zwiększenie nasycenia pożywki tlenem bądź dwutlenkiem węgla. W hodowlach prowadzonych w warunkach tlenowych efektem pożądanym jest uzyskanie jak najwyższego stężenia tlenu rozpuszczonego w pożywce. Wartość ta jest ograniczona rozpuszczalnością tlenu w wodzie. W hodowlach organizmów beztlenowych perfluoroalkany stosowane są jako nośnik dwutlenku węgla lub ewentualnie do odbierania z układu wytwarzanego przez wzrastające komórki tlenu, który może działać hamująco bądź toksycznie na prowadzoną hodowlę. Przykłady zastosowania perfluorozwiązków w hodowlach mikroorganizmów zestawiono w tabeli 4, a niektóre z nich, bardziej szczegółowo omówiono w dalszej części artykułu.

Tabela 4

Zastosowania perfluorozwiązków w hodowlach mikroorganizmów (na podstawie [1,5])

Gatunek	Perfluorozwiązek	Efekt	Literatura
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	PFTBA (e)	wydłużenie wykładniczej fazy wzrostu	[1,5]
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	PFTBA (c)	zwiększenie szybkości przyrostu biomasy	[1,5]
<i>Caenorhabditis elegans</i>	PFD (c)	przyspieszenie rozwoju larw, zwiększenie rozmiaru osobników	[37]
<i>Candida lipolytica</i>	PFTBA (e)	zwiększenie szybkości przyrostu biomasy	[1,5]
<i>Chlorella vulgaris</i>	PFO (c)	usuwanie tlenu z układu, przyrost biomasy	[1,38]
<i>Escherichia coli</i>	PFTBA (e), PFMD (c)	zwiększenie szybkości przyrostu biomasy	[1,5]
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	PFO (e)	wzrost szybkości redukcji podtlenu azotu	[1,39]
<i>Rhizopus arrhizus</i>	PFD (c)	zwiększenie produktywności lipazy	[40]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PFD (e)	zwiększenie szybkości przyrostu biomasy	[35,41]
<i>Streptomyces coelicolor</i>	PFD (e)	zwiększenie produktywności antybiotyku	[42-46]

skrót: PFTBA – perfluorotributyloamina; PFD – perfluorodekalina; PFO – perfluorooktan; PFMD – perfluorometylodekalinę; związek perfluorowany w postaci czystej (c) lub emulgowanej (e)

Pierwsze doniesienia literaturowe o wykorzystywaniu perfluorowanego nośnika tlenu w hodowli mikroorganizmów pochodzą z połowy lat osiemdziesiątych ubiegłego stulecia. Perfluorometylodekalinę zastosowano wówczas do natleniania bioreaktorowej hodowli komórek *Escherichia coli* [3,5]. W górnej części aparatu rozpylano krople czystego perfluoroalkanu, który następnie na skutek zachodzącej koalescencji zbierał się na dnie zbiornika skąd był pobierany i zwracany do wnętrza reaktora po uprzednim zregenerowaniu w zewnętrznej komorze do nasycania tlenem. W prowadzonej w ten sposób hodowli uzyskano ponad sześciokrotny przyrost biomasy, w porównaniu z procesem tradycyjnym (bez ciekłego nośnika tlenu), przy czym nie zanotowano żadnych niekorzystnych zmian morfologicznych ani fizjologicznych wzrastających komórek bakterii [1]. Dwukrotny wzrost stężenia komórek *E. coli* uzyskano stosując podczas fermentacji perfluorotributyloaminę. W tym przypadku faza perfluorozwiązku rozpraszana była za pomocą tradycyjnego mieszadła Rushtona podczas intensywnego mieszania zawartości reaktora, w którym prowadzono hodowlę [5].

Perfluorozwiązki stosowano także do natleniania hodowli drożdży oraz grzybów strzępkowych. Dodatek emulsji perfluorodekaliny i niejonowego surfaktantu Pluronic F-68 (kopolimeru glikoli: polietylenowego oraz propylenowego) spowodował ponad 20% wzrost stężenia otrzymanej biomasy *Saccharomyces cerevisiae* po dwudziestu godzinach prowadzenia hodowli w stosunku do hodowli bez PFC w pożywce. Pomiar stężenia rozpuszczonego w pożywce tlenu pokazały, że w układzie z emulsją perfluorozwiązku około dwukrotnie zwiększyła się wartość współczynnika wymiany masy $k_L a$ w porównaniu do hodowli w pożywce kontrolnej. Dodatek

perfluorozwiązku spowodował zwiększenie szybkości wnikania tlenu do pożywki. Nie stwierdzono wpływu tego sposobu napowietrzania na wartość współczynnika wydajności biomasy względem substratu. Badania prowadzono w reaktorach o pojemności 1 dm³ [41] oraz w reaktorze *air-lift* o pojemności 4,5 dm³ [35].

Perfluorowane nośniki tlenu wykorzystywano także we wglębnych hodowlach komórek pleśni *Streptomyces coelicolor*. Szczep ten wytwarza cztery różne antybiotyki, a jednym z tych metabolitów wtórnych jest aktynorodyna (*actinorhodin*) – poliketony, nieterapeutyczny antybiotyk, wydzielany zewnątrzkomórkowo do medium hodowlanego. Zastosowanie w trakcie laboratoryjnej hodowli grzybni we wstrząsanych kolbach Erlenmeyera 50% dodatku perfluorodekaliny spowodowało aż dziesięciokrotny wzrost stężenia wydzielanego do płynu hodowlanego antybiotyku podczas tygodniowej hodowli. W hodowli z natlenianiem wspomaganym przez dodatek PFC maksimum stężenia antybiotyku obserwowano około 48 godzin wcześniej niż dla hodowli kontrolnej. Stężenie biomasy (wyrażone jako sucha masa uzyskana z jednostki objętości reaktora) zwiększyło się przy tym tylko dwukrotnie. Ciekły nośnik tlenu był wprowadzony do badanego układu w postaci dyspersji emulgowanej surfaktantem Pluronic F-68 [42]. Dzięki zastosowaniu 10% dodatku związku perfluorowanego do hodowli *Streptomyces coelicolor* w bioreaktorze zaobserwowano dwukrotny wzrost współczynnika wymiany masy $k_L a$ w porównaniu z hodowlą napowietrzaną w tradycyjny sposób. Spowodowało to wzrost produktywności antybiotyku przez komórki pleśni. Maksymalne uzyskane stężenie aktynorodyny w płynie hodowlanym wynosiło 90 mg/dm³, podczas gdy w hodowli napowietrzanej pęcherzykowo wartość ta wynosiła 45 mg/dm³. Jednocześnie zanotowano spadek stężenia biomasy z 5,7 do 2,9 kg/m³. W obecności perfluoroalkanu zmieniła się morfologia wzrastającej grzybni – zaobserwowano zmniejszenie się tendencji do formowania się komórek w peletki. Zjawisko to starano się wytłumaczyć prawdopodobnym wpływem zwiększonego stężenia tlenu w pożywce na mechanizm przekazywania bodźców przez poszczególne komórki, które warunkują zbijanie się komórek w większe skupiska [43]. Na podstawie otrzymanych wyników z późniejszych doświadczeń wykazano, że we wglębnych hodowlach *Streptomyces coelicolor* prowadzonych w bioreaktorach (o pojemności 2 oraz 20 dm³), udział fazy perfluorowanej w pożywce silnie wpływa na wydajność biosyntezy antybiotyku przez komórki grzybni. Wraz ze wzrostem stężenia ciekłego nośnika tlenu obserwowano wzrost stężenia aktynorodyny aż do osiągnięcia maksymalnej jego wartości dla 50% stężenia perfluorodekaliny w płynie fermentacyjnym. Maksymalne stężenie metabolitu wtórnego było wówczas pięciokrotnie wyższe od uzyskanego w próbie kontrolnej z tradycyjnym napowietrzaniem (bez perfluoroalkanu), podczas gdy stężenie biomasy pozostawało na niezmiennym poziomie [44,45].

Emulsję perfluorodekaliny użyto także do napowietrzania immobilizowanych komórek *Streptomyces coelicolor*. Badania te miały na celu określenie przydatności związków perfluorowanych do dostarczania tlenu do komórek unieruchomionych w nośniku. Najwyższe, ponad trzykrotnie wyższe, stężenie antybiotyku w płynie ho-

dowlanym zanotowano w przypadku 40% dodatku perfluorowanego nośnika tlenu, przy czym stężenie biomasy pozostało na niezmiennym poziomie. Dalsze zwiększanie stężenia użytego perfluorozwiązku powodowało drastyczny spadek stężenia badanego metabolitu wtórnego. Unieruchomione komórki *S. coelicolor* zachowywały niezmienną produktywność aktynorodyny przez dwa miesiące prowadzenia hodowli. Podczas hodowli z tradycyjnym napowietrzaniem, unieruchomiona grzybnia traciła aktywność już po dwudziestu dniach prowadzenia procesu [46].

Również wyniki uzyskane podczas hodowli wglębnej komórek *Rhizopus arrhizus* potwierdzają hipotezę o wpływie zwiększonego stopnia natlenienia pożywki na szybkość wytwarzania przez wzrastające komórki określonych metabolitów. Okazało się, że 20% dodatek perfluorodekaliny do płynu fermentacyjnego spowodował dwukrotny wzrost aktywności lipolitycznej płynu fermentacyjnego w porównaniu z próbą kontrolną. Był to wynik wzrostu stężenia wytwarzanej lipazy. Enzym ten wytwarzany jest przez komórki *R. arrhizus* zewnątrzkomórkowo tylko, gdy stężenie tlenu w pożywce przekracza pewną graniczną wartość [40].

Wysoką rozpuszczalność tlenu w związkach perfluorowanych wykorzystać można nie tylko do dostarczania tego gazu do medium hodowlanego, ale również do usuwania tlenu powstającego w wyniku wzrostu drobnoustrojów. Okazuje się, że stężenie tlenu w płynie fermentacyjnym wyższe niż wartość jego stężenia wynikająca z nasycenia pożywki powietrzem atmosferycznym (tzn. powyżej 0,2247 mM O₂ w temperaturze 20°C), działa hamująco na przebieg procesu fotosyntezy. W hodowlach glonów obserwuje się hamowanie wzrostu wywołane wysokim stężeniem tlenu. Perfluorowany preparat FC-77 (produkowany przez 3M, USA), który jest mieszaniną perfluoroalkanów i perfluorocyklicznego eteru, wykorzystano do usuwania tlenu z hodowli fotosyntetyzujących glonów mikroskopowych z gatunku *Chlorella vulgaris*. Perfluorowany nośnik natleniany był w naczyniu hodowlanym tlenem generowanym przez glony na drodze fotosyntezy, skąd był recykulowany tak, by po przejściu przez zewnętrzny moduł do nasycania dwutlenkiem węgla powrócić do naczynia, w którym prowadzono hodowlę. W ten sposób z układu jednocześnie usuwano czynnik hamujący przyrost biomasy *Chlorella vulgaris* (O₂) oraz doprowadzano do niego źródło węgla (CO₂). Takie rozwiązanie umożliwiło uzyskanie dziesięciokrotnie większego przyrostu biomasy glonów w hodowli prowadzonej przez 10 dni. W układzie z ciekłym nośnikiem O₂/CO₂ końcowe stężenie wyniosło $4,8 \times 10^6$ komórek/ml płynu hodowlanego wobec wartości $3,9 \times 10^5$ komórek/ml uzyskanej w układzie bez dodatku perfluoroalkanu [38].

Jako medium pośredniczące w dostarczaniu dwutlenku węgla do bioreaktora związki perfluorowane wykorzystywane były z powodzeniem w hodowlach takich beztlenowych mikroorganizmów jak: *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium perfringens* czy *Alcaligenes eutrophus* [1,5]. Perfluorooktan został wykorzystany jako nośnik N₂O w hodowli *Pseudomonas denitrificans*. Szybkość redukcji N₂O do azotu cząsteczkowego zachodziła blisko trzy razy szybciej w tych kolbach Erlenmeyera, w których płyn hodowlany utworzony był przez dwie fazy ciekłe: wodną i perfluorowaną [39].

Interesującym zastosowaniem perfluorozwiązków, wykraczającym poza hodowlę mikroorganizmów, jest wykorzystanie perfluorodekaliny do dostarczania tlenu w bioreaktorowej hodowli przedstawiciela jednego z gatunków nicieni: *Caenorhabditis elegans*. Organizm ten jest wykorzystywany jako modelowy w genetyce i genomice (znana jest już prawie cała sekwencja jego genów). Innym praktycznym zastosowaniem tego nicienia jest używanie go do określania toksyczności wody i gleby. *C. elegans* hodowany był w dwufazowym układzie: faza wodna, w której rosły nicienie oraz faza perfluorowana jako medium natleniające fazę wodną. Okazało się, że dodatek perfluorodekaliny spowodował wyraźnie szybszy rozwój postaci larwalnych nicienia. Organizmy hodowane z perfluorowanym nośnikiem tlenu wykazywały się ponadto większymi rozmiarami ciała [37]. Badania te były prawdopodobnie pierwszym przypadkiem hodowli całego organizmu eukariotycznego w układzie dwufazowym z zastosowaniem perfluoroalkanu.

4.2. Hodowle komórek roślinnych

Korzystny wpływ zwiększonego stężenia tlenu na hodowane *in vitro* komórki roślinne wykazywany był wielokrotnie [1,47]. Przykładowo, zastosowanie wzbogaconej w tlen (40%) mieszanki gazowej do natleniania węgłnej hodowli komórek ryżu (*Oryza sativa* L.) pozwoliło uzyskać 40% wzrost wydajności biomasy w porównaniu do aeracji powietrzem atmosferycznym. Agregaty komórek pochodzące z reaktora napowietrzanego wzbogaconą mieszką gazów wykazywały się ponad 50% większą zdolnością do regeneracji całych roślin [47]. Tradycyjne systemy napowietrzania z mieszaniem mechanicznym mogą powodować niszczenie komórek roślinnych. Użycie perfluorozwiązków jako ciekłych nośników tlenu, pozwala zmniejszyć stres hydrodynamiczny. W tabeli 5 przedstawiono przykładowe zastosowania związków perfluorowanych w hodowlach komórek roślinnych.

Tabela 5

Zastosowania perfluorozwiązków w hodowlach komórek roślinnych

Gatunek	Perfluorozwiązek	Efekt	Literatura
<i>Atropa belladonna</i>	perfluorododekan (O_2)	zwiększenie przyrostu biomasy korzeni włośnikowatych	[48]
<i>Oryza sativa</i>	perfluorodekalina (O_2)	wzrost liczby kolonii komórek uzyskanych z protoplastów	[49]
		poprawa żywotności zamrożonych komórek	[50,51]
<i>Petunia hybrida</i>	perfluorodekalina (O_2)	wzrost liczby kolonii komórek uzyskanych z protoplastów	[1,52]
<i>Rosa chinensis</i>	perfluorodekalina (CO_2)	wzrost indukcyjności pędów i korzeni uzyskanych z kultur komórkowych	[53]

skrótly: (O_2) – perfluorozwiązek nasycony tlenem; (CO_2) – PFC nasycony dwutlenkiem węgla

Zwiększenie stężenia tlenu w reaktorowych hodowlach roślinnego materiału biologicznego ma szczególne znaczenie w kulturach protoplastów komórek (czyli komórek pozbawionych ścian komórkowych, które zostały na przykład strawione enzymatycznie). W środowiskach o zwiększonej dostępności tlenu obserwuje się wzrost częstości mitotycznych podziałów protoplastów. Regeneracja pędów z kultur komórkowych uzyskanych z protoplastów jest szeroko stosowana w biotechnologii roślin [54].

Perfluorowany nośnik tlenu po raz pierwszy zastosowano w hodowlach protoplastów otrzymanych z komórek petunii ogrodowej (*Petunia hybrida* L.). Protoplasty wzrastały na powierzchni międzyfazowej, utworzonej pomiędzy warstwą wodną pożywki a warstwą natlenionej perfluorodekaliny. Faza wodna zawierała dodatek surfaktantu Pluronic F-68, który miał za zadanie ułatwić dyfuzję tlenu przez powierzchnię międzyfazową. W badanym układzie zaobserwowano przyspieszenie procesu syntezy nowych ścian komórkowych zachodzącego przed pierwszym podziałem mitotycznym protoplastów. W porównaniu z próbami kontrolnymi zanotowano prawie 40% wzrost zdolności wyizolowanych protoplastów do wytwarzania wielokomórkowych kolonii. Niestety podczas tego procesu komórki petunii traciły zdolność do regeneracji pędów [1,52]. W celu zwiększenia stężenia tlenu w pożywce do hodowli protoplastów komórek rośliny tego samego gatunku użyto także preparatu bydłowej hemoglobiny o nazwie Erythrogen® (TCS Biologicals, UK). W porównaniu z próbą kontrolną, w układzie z hemoglobina zanotowano prawie 2,5-krotnie większy przyrost biomasy [55]. Badania hodowli protoplastów komórek *Petunia hybrida* L. należy traktować jako czysto jakościowe, gdyż prowadzone były w mikroskali, a nasycony tlenem nośnik, czy to perfluoroalkan czy hemoglobina, dodawany był tylko raz – na początku prowadzenia hodowli. Wyniki tych badań potwierdzają jednak słuszność założeń o możliwości wykorzystania sztucznych, w tym także perfluorowanych, nośników tlenu w hodowlach komórek roślinnych w warunkach *in vitro*.

Nasyconą tlenem perfluorodekalinę zastosowano w hodowli ryżu (*Oryza sativa* L.) w celu zwiększenia dostępności tlenu do protoplastów i rozwijających się z nich kolonii komórek [49]. Stwierdzono, że dobre natlenienie medium hodowlanego wpływa na ożywienie mitotycznych podziałów protoplastów oraz na proces regeneracji pędów z kultur komórkowych otrzymanych z protoplastów komórek ryżu. O 50%, w porównaniu z próbą kontrolną niezawierającą perfluorowanego nośnika tlenu, zwiększyła się, liczba protoplastów, zdolnych do wytwarzania pędów. Liczba pędów uzyskanych z jednej kolonii komórek rozwiniętych z ich protoplastów zwiększyła się ponad 3-krotnie. W hodowlach napowietrzanych sztucznym nośnikiem tlenu otrzymywano średnio 7 pędów z jednej kolonii, podczas gdy w układach kontrolnych tylko dwa pędy. Po zakończeniu procesów regeneracji roślin z kultur komórkowych wywodzących się z ich protoplastów przesadzono je z podłoża agarowego do gleby. Wszystkie otrzymane, w pełni rozwinięte rośliny zakwitły, a na podstawie analizy morfologicznej i przeprowadzonych pomiarów charakterystycznych cech genotypowych (m. in. diploidalność) i morfologicznych

(np. wysokość roślin, długość i szerokość liści, wymiary kwiatostanów, żywotność wytworzonego pyłku), wykazano, że nie odbiegały one w żadnym stopniu od roślin wyhodowanych w standardowych warunkach [49]. Wyniki opisanych badań wykazały brak toksycznego wpływu perfluorozwiązków na roślinny materiał biologiczny hodowanych w warunkach *in vitro*.

Perfluorowany nośnik tlenu stosowano w hodowli korzeni włośnikowatych porzeczki wilczej jagody (*Atropa belladonna* L.). W bioreaktorze membranowym, w którym zastosowano dodatek perfluorododekanu (produkowanego przez 3M perfluorowanego preparatu o handlowej nazwie Fluoroinert® FC-43) uzyskano ponad 60% większy przyrost biomasy hodowanych korzeni niż w reaktorze zasilanym powietrzem. Podczas prowadzenia procesu nie stwierdzono obecności produktów metabolizmu charakterystycznych dla warunków beztlenowych, tj. kwasu mlekowego czy etanolu. Związki te są obecne w płynie hodowlanym w reaktorach napowietrzanych w tradycyjny sposób [48]. Perfluoroalkany mogą posłużyć zatem do usprawnienia napowietrzania hodowli *in vitro* korzeni włośnikowatych. W tego typu hodowlach upakowanie przestrzenne uzyskiwanych korzeni jest niekiedy wysokie, co powoduje trudności w wymianie masy w reaktorze.

Natlenione perfluorozwiązki można także wykorzystać do pobudzania wzrostu komórek roślinnych zamrożonych w ciekłym azocie (-196°C). Technika przechowywania biomasy roślinnej (*cryopreservation*) pozwala uniknąć niekorzystnych zjawisk, takich jak: utrata zdolności totipotencji, zmiany genetyczne czy spadek produktywności określonego metabolitu wtórnego. W trakcie rozmrażania materiału roślinnego i pobudzania komórek do wzrostu napotyka się na szereg trudności wynikających ze znacznych zmian w morfologii i fizjologii komórek poddawanych zamrożeniu. Czysto fizycznym zmianom w strukturze komórki można przeciwdziałać stosując na przykład odpowiednie płyny kriochronne (tzw. krioprotektanty), których funkcją jest niedopuszczanie do powstawania lub znaczne ograniczanie tworzenia się kryształków lodu wewnątrz komórek i w bezpośrednim ich sąsiedztwie. Jednym z czynników wpływających na metabolizm przechowywanych komórek jest spadek stężenia tlenu, powodujący zachwianie równowagi procesów oddechowych i powstawanie wolnych rodników. *In vivo* wolne rodniki odpowiedzialne są za wytwarzanie grup nadtlenowych w kwasach tłuszczowych oraz za degradację białek [50].

W badaniach przeprowadzonych na rozmrażanych komórkach ryżu (*Oryza sativa* L.) używano natlenionej perfluorodekaliny. Wyniki doświadczeń pokazują, że w porównaniu z próbą kontrolną, o prawie 25% zwiększyła się żywotność rozmrożonych po długotrwałym (trzyletnim) przechowywaniu komórek w próbach, w których proces rozmrażania przeprowadzano w obecności natlenionej perfluorodekaliny. W przypadku 0,01% dodatku detergentu Pluronic F-68 wartość ta wzrosła o blisko 60%. Obserwowane wyniki tłumaczyć można wpływem zwiększonego stężenia tlenu w otoczeniu komórki, które wpływa na wzrost aktywności dyzmutazy nadtlenkowej – wewnątrzkomórkowego enzymu odpowiadającego m.in. za redukcję powstających w komórce wolnych rodników [50,51].

Wysoką rozpuszczalność gazów oddechowych w związkach perfluorowanych można wykorzystać nie tylko do natleniania hodowanych *in vitro* komórek roślinnych, ale także do zapewnienia w badanych układach wysokiego stężenia dwutlenku węgla. Perfluorodekalina została zastosowana jako nośnik dwutlenku węgla w półpłynnej pożywce do hodowli kultur komórkowych jednej z odmian róży pnącej (*Rosa chinensis* Jacq.). Przez pożywkę przepuszczano okresowo dwutlenek węgla. W porównaniu z hodowlą kontrolną, w której nie zastosowano dodatku perfluorowanego nośnika dwutlenku węgla, zanotowano prawie 50% wzrost efektywności indukcji pędów z hodowanych kultur komórkowych. W próbach zawierających perfluoroalkany uzyskiwano prawie dwa razy więcej biomasy wytworzonych pędów niż w próbach kontrolnych. Innym dodatnim efektem zastosowania perfluorowanego nośnika dwutlenku węgla był wyraźny, bo ponad 30% wzrost liczby wytworzonych podczas indukcji pędów korzeni. Wzrost korzeni jest często hamowany przez powstające związki fenolowe. Na podstawie przeprowadzonej analizy składu homogenizatu korzeni wykazano znaczący spadek stężenia tych związków w tkankach roślin wyhodowanych w podłożu z dodatkiem perfluorodekaliny nasyconej dwutlenkiem węgla. Prawdopodobnie efekt ten związany jest ze zwiększeniem aktywności oksydazy fenolowej, enzymu odpowiedzialnego za proces utleniania związków fenolowych do tzw. barwników chininowych [53].

4.3. Hodowle komórek zwierzęcych

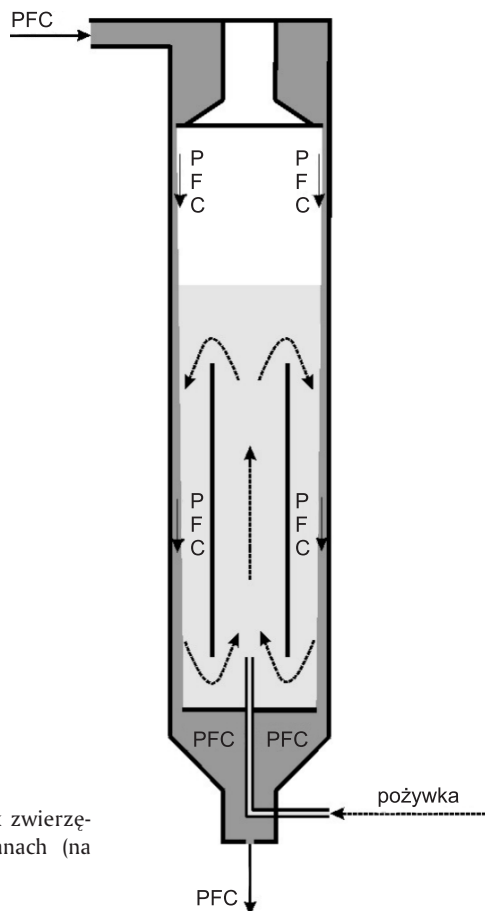
Hodowle *in vitro* zwierzęcych kultur komórkowych, w których jako nośniki tlenu wykorzystuje się związki perfluorowane podzielić można na dwa rodzaje. Pierwszy z nich polega na wglębnej hodowli komórek w reaktorze z rozproszonymi kroplami perfluoroalkanu. Drugi rodzaj hodowli, stosowany do komórek adhezyjnie zależnych, polega na wzroście komórek na powierzchni międzyfazowej utworzonej na granicy fazy wodnej i perfluorowanej. Przykładowe zastosowania perfluorozwiązków w biotechnologii komórek zwierzęcych przedstawione zostały w tabeli 6.

Tabela 6

Zastosowania perfluorozwiązków w hodowlach komórek zwierzęcych

Gatunek	Perfluorozwiązek	Efekt	Literatura
<i>Spodoptera frugiperda</i> owad (w)	perfluorotributyłamina	wzrost stężenia biomasy; wzrost produktywności zrekombinowanego białka	[56-58]
mysz (w)	perfluorotributyłamina	wzrost stężenia biomasy	[1,5]
mysz (p)	perfluorotributyłamina, perfluorooktan	różnice w morfologii wzrastających komórek; tworzenie wielokomórkowych agregatów	[59]

skrót: (w) – hodowla wglębna zawiesiny komórek; (p) – hodowla komórek na powierzchni międzyfazowej



Rys. 3. Schemat reaktora do hodowli komórek zwierzęcych z perfluorozwiązkiem spływającym po ścianach (na podst. [56]).

Perfluorozwiązki stosowane były w celu zwiększenia natlenienia medium hodowlanego we wgłębnych hodowlach zawieszin komórek zarówno bezkręgowców (owadów), jak i zwierząt kręgowych (ssaków) [1,56]. Opracowanych zostało wiele rozwiązań procesowych, których celem była redukcja negatywnego wpływu sztucznie stworzonego środowiska wzrostu na hodowane komórki. Przykładem takiego rozwiązania jest bioreaktor kolumnowy, w którym po wewnętrznych ścianach, w sposób ciągły, spływał perfluorowany nośnik tlenu (rys. 3). Zbierająca się w dolnej części zbiornika perfluorotributyloamina była zwracana i po nasyceniu tlenem w zewnętrznym układzie do natleniania ponownie podawana na ściany reaktora. Spływająca warstwa perfluorozwiązku nie tylko nasyciała tlenem pożywkę, lecz jej ruch wywoływał łagodne mieszanie zawartości zbiornika. W opisany sposób hodowane były komórki poczwarki jednego z gatunków motyli, należącego do rodziny sówek *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) [56]. Po 48 godzinach prowadzenia procesu uży-

skano dwa razy większy przyrost biomasy (gęstość komórek: $2,9 \times 10^6$ komórek/ml) w porównaniu do kultury wzorcowej bez dodatku perfluorotributyloaminy ($1,4 \times 10^6$ komórek/ml) wzrastającej w wirowanej kolbie Erlenmeyera, przy zachowaniu identycznej wartości (80%) żywotności komórek. W trakcie wglębnej hodowli komórek poczwarki prowadzonej w reaktorze zbiornikowym, uzyskano o 60% większy przyrost biomasy w porównaniu do hodowli kontrolnej napowietrzanej w sposób tradycyjny, czyli fazą gazową [57]. Hodowane *in vitro* komórki owadów mogą zostać wykorzystane na przykład do produkcji przeciwciał monoklonalnych. Wykazany został także korzystny wpływ stężenia tlenu rozpuszczonego w medium hodowlanym na wydajność produkcji żądanego zrekombinowanego białka przez uprzednio genetycznie zmodyfikowane komórki *Spodoptera frugiperda* [57,58].

Związki perfluorowane stosowano także w hodowli wglębnej zawiesiny mysich komórek hybrydowych. Komórki te używane są m.in. do produkcji przeciwciał monoklonalnych. Otrzymuje się je w wyniku fuzji komórek szpiczaka i limfocytów uzyskanych z immunizowanych myszy. Zwiększenie stężenia tlenu w pożywce wywołane obecnością emulsji perfluorotributyloaminy w hodowli komórek hybrydowych wydłużyło wykładniczą fazę ich wzrostu. Wynikiem tego był ponad sześciokrotny wzrost stężenia żywych komórek w płynie hodowlanym w porównaniu do kultury komórkowej wzrastającej w warunkach tradycyjnego natleniania. Hodowle prowadzono w obracających się szklanych tubach, w których natlenianie medium hodowlanego zachodziło na skutek przelewania się zawartości. W badaniach stosowano 10% dodatek emulsji PFC [1,5].

Wiele rodzajów komórek zwierzęcych wykazuje zdolność wzrostu tylko w przypadku ich kontaktu ze stałą powierzchnią. Okazało się, że stałe, syntetyczne nośniki wprowadzane do bioreaktorów w celu zapewnienia kontaktu z podłożem wzrastającym komórkom mogą być z powodzeniem zastąpione powierzchnią międzyfazową, wytworzoną między fazą wodną pożywki a hydrofobową fazą perfluorowanego ciekłego nośnika tlenu. Takie rozwiązanie procesowe pozwala na czerpanie korzyści wynikających zarówno z zaspokojenia środowiskowych wymagań komórek jak i ze zwiększonej dostępności tlenu do płynu hodowlanego. W przypadku powierzchni kontaktu zapewnianej przez dwie niemieszające się cieczce wzrost komórek odbywa się nie bezpośrednio na granicy faz, lecz na wytworzonej przez same komórki cienkiej, białkowej warstwie. Jej tworzenie jest prawdopodobnie stymulowane przez węglowodorowe zanieczyszczenia obecne w komercyjnie dostępnych perfluorowanych preparatach [1,5]. Kolejną zaletą wynikającą z zastosowania układów z powierzchnią międzyfazową ciecz/ciecz jest łatwiejsza izolacja otrzymanych komórek po zakończeniu hodowli. Mogą one zostać oddzielone od płynu hodowlanego przez wirowanie, bądź mechaniczne zebranie ich warstwy znad powierzchni międzyfazowej. Nie ma, bowiem potrzeby stosowania metod izolacji komórek z tradycyjnych metod hodowli komórek adhezjozależnych, takich jak odklejanie trypsyną (trypsynizacja) [59].

Wyniki uzyskane podczas hodowli mysich komórek [59] (pochodzących z linii komórkowej L-929) w układach dwufazowych: faza wodna/faza perfluorowazwiązki,

potwierdziły przydatność takiego rozwiązania procesowego do hodowli adhezjozależnych komórek zwierzęcych. Zarówno krzywe wzrostu jak i uzyskiwane w trakcie hodowli wartości stężeń żywych komórek nie odbiegały w znaczący sposób od wartości otrzymanych w układach kontrolnych, w których powierzchnię do wzrostu stanowiło polistyrenowe naczynie hodowlane. Różna natomiast była morfologia komórek wzrastających na odmiennych powierzchniach. Komórki hodowane na powierzchni polistyrenowej rosły w postaci pojedynczej warstwy, natomiast komórki rosnące na powierzchni międzyfazowej woda/PFC tworzyły przestrzenne, półkuliste struktury, charakterystyczne dla komórek wątroby hodowanych w warunkach *in vitro*. Odmienności te wynikają z różnic w fizycznych właściwościach badanych powierzchni międzyfazowych.

5. Perspektywy rozwoju zastosowań perfluorozwiązków w biotechnologii

Związki perfluorowane posiadają duży potencjał aplikacyjny w biotechnologii. Dotyczy on przede wszystkim możliwości wykorzystania perfluoroalkanów jako nośników tlenu w bioreaktorowych hodowlach komórkowych organizmów eukariotycznych. W przeprowadzonych dotychczas doświadczeniach okazuje się, że dla układów o wyższej zawartości tlenu osiągnię są większe przyrosty biomasy. W wielu przypadkach produktywność określonego, technologicznie pożądanego metabolitu komórkowego jest również większa. Niska rozpuszczalność tlenu w wodzie, jak się okazuje, jest często czynnikiem limitującym szybszy rozwój wzrastających komórek oraz ograniczającym częstość ich podziałów. Woda jest jednak podstawowym składnikiem wszystkich pożywek stosowanych w bioreaktorowych hodowlach wgłębnych i nie da się jej zastąpić żadnym innym rozpuszczalnikiem.

Komórki roślin jak i zwierząt są wrażliwe na działanie sił ścinających generowanych w trakcie intensywnego mieszania i napowietrzania pożywki hodowlanej. W rozwiązaniach praktycznych poszukuje się zatem kompromisu pomiędzy zapewnieniem odpowiednich warunków do wymiany gazowej a prowadzeniem hodowli w łagodnych warunkach hydrodynamicznych, sprzyjających wzrostowi i podziałom komórek. Na szczególną uwagę w inżynierii bioreaktorów zasługują rozwiązania procesowe pozwalające ominąć przedstawioną trudność przez zastosowanie niekonwencjonalnych technik napowietrzania. Specyficzne właściwości fizykochemiczne związków perfluorowanych pozwalają stosować je jako ciekłe nośniki tlenu, a także jako nośniki dwutlenku węgla lub gazowych produktów metabolizmu hodowanych komórek. Wykorzystanie obojętnego (neutralnego) nośnika gazów fizjologicznych, którego zdolność do wiązania tlenu wielokrotnie przewyższa jego rozpuszczalność w wodzie, pozwala na zmniejszenie wymaganej szybkości przepływu pożywki hodowlanej przez przestrzeń wewnętrzną bioreaktorów. Konsekwencją tego jest ograniczenie negatywnego wpływu na komórki czynników odpowiedzial-

nych za generowanie w wyniku intensywnego mieszania oraz pęcherzykowego natleniania pożywki sił ścinających.

Czynnikiem ograniczającym stosowanie perfluorozwiązków w biotechnologii może być wysoki koszt dostępnych komercyjnie preparatów perfluorowanych. Przykładowa cena jednego z najczęściej używanych w badaniach cyklicznego perfluoroalkanu – perfluorodekaliny wynosi około 500 USD za litr preparatu (dane z 2004 r.). Dodatek PFC do hodowli nie przekracza wprawdzie 20% objętości pożywki zatem wysoki koszt nośnika gazów nie ogranicza, jak się wydaje, rozwoju doświadczalnych badań laboratoryjnych. Cena perfluoroalkanów może za to ujemnie wpływać na ekonomikę ich wykorzystania w skali przemysłowej. Jednakże inertność nośnika tlenu oraz jego niemieszalność z fazą wodną umożliwia recyrkulację praktycznie całej jego ilości wprowadzonej do układu hodowlanego. Odzyskany z reaktora perfluorozwiązek może być następnie ponownie sterylizowany, nasycany odpowiednim gazem i ponownie używany w tym samym lub innym procesie. Wszystkie te operacje ograniczają, a wręcz eliminują jakikolwiek negatywny wpływ tej grupy związków na środowisko naturalne podczas ich laboratoryjnego użycia. Recyrkulacja i regeneracja perfluorowanych preparatów powoduje także znaczną redukcję nakładów finansowych poniesionych w związku z zakupem perfluorozwiązków w przeliczeniu na jednostkowe ich użycie. Zastosowanie perfluorozwiązków w biotechnologii jest najczęściej związane z produkcją preparatów o wysokiej cenie jednostkowej (środki farmaceutyczne, przeciwciała monoklonalne, genetycznie zmodyfikowane komórki), co uzasadnia wysokie koszty stosowanych technik.

Pochodzące z ostatnich piętnastu lat doniesienia literaturowe o wykorzystaniu perfluoroalkanów jako czynnika dostarczającego tlen w hodowlach komórek roślinnych i zwierzęcych zawierają tylko jakościowe informacje na ten temat. Brak jest ścisłych danych ilościowych pozwalających na racjonalne projektowanie bioreaktorów, w których perfluorozwiązki są wykorzystywane jako nośniki tlenu. Niewiele jest również specyficznych rozwiązań procesowo-aparaturowych pozwalających na efektywne prowadzenie procesów biotechnologicznych z udziałem ciekłych nośników gazów oddechowych.

Literatura

1. Lowe K. C., (2002), *J. Fluor. Chem.*, 118, 19-26.
2. Krafft M. P., (2003), *Curr. Op. Coll. Interface Sci.*, 8, 213-214.
3. Krafft M. P., Riess J. G., (1998), *Biochimie*, 80, 489-514.
4. Krafft M. P., (2001), *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 47, 209-228.
5. Lowe K. C., Davey M. R., Power J. B., (1998), *TRIBTECH*, 16, 272-277.
6. Giesy J. P., Kannan K., (2001), *Env. Sci. Tech.*, 35, 1339-1342.
7. Lowe K. C., (1999), *Blood. Rev.*, 13, 171-184.
8. Stryer L., (2000), *Biochemia*, PWN, Warszawa.
9. Lane T. A., (1995), *Transf. Apheresis Sci.*, 16, 19-31.

10. Lowe K. C., (2001), *J. Fluor. Chem.*, 109, 59-65.
11. Hirschl R. B., (2004), *Pediatr. Respir. Rev.*, 5A, 339-345.
12. Shefler A., (1999), *Cur. Paediatr.*, 9, 57-61.
13. Leach C. L., Greenspan J. S., Rubenstein D., Shaffer T. H., Wolfson M. R., Jackson J. C., DeLemos R., Fuhrman B. P., (1996), *N. England J. Med.*, 335, 761-766.
14. Wolfson M. R., Greenspan J. S., Shaffer T. H., (1996), *Pediatr.*, 97, 449-455.
15. Venkataraman S. T., Kochanek P. M., (1999), *Crit. Care Med.*, 27, 2589-2591.
16. Chang T. M. S., (2000), *Baillière's Clinic. Haem.*, 13, 651-667.
17. Spahn D. R., (2000), *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 40, 143-151.
18. Habler O. P., Messmer K. F., (2000), *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 40, 171-184.
19. Riess J. G., Krafft M. P., (1998), *Biomaterials*, 19, 1529-1539.
20. Kabalnov A., Weers J., Arlauskas R., Tarara T., (1995), *Langmuir*, 11, 2966-2974.
21. Taylor P., (1998), *Adv. Coll. Interface Sci.*, 75, 107-163.
22. Scott M. G., Kucik D. F., Goodnough L. T., Monk T. G., (1997), *Clinic. Chem.*, 43, 1724-1731.
23. Shawn D. S. P., Imber C. J., Friend P. J., (2002), *The Lancet*, 359, 604-613.
24. Dutkowski P., Schönfeld S., Odermatt B., Heinrich T., Junginger T., (1998), *Cryobiol.*, 36, 61-70.
25. Scheule A. M., Bohl A., Heinemann M. K., Ziemer G., Henze E., (1997), *Eur. J. Card. Thor. Surg.*, 11, 746-750.
26. Scheule A. M., Pappas I., Vogel U., Miller S., Roehlke W., Reuter P., Wendel H. P., Ziemer G., (2000), *Transplant. Proceed.*, 32, 192-195.
27. Gohra H., Mori F., Esato K., (1997), *Ann. Thor. Surg.*, 63, 594-595.
28. Goodnough L. T., Shander A., Brecher M. E., (2003), *The Lancet*, 361, 161-169.
29. Chang T. M. S., (1999), *TRIBTECH*, 17, 61-67.
30. Riess J. G., (2002), *J. Fluor. Chem.*, 114, 119-126.
31. Riess J. G., (2002), *Tetrahedron*, 58, 4113-4131.
32. Joshi J. B., Elias C. B., Patole M. S., (1996), *Chem. Eng. J.*, 62, 121-141.
33. Pohorecki R., Bałdyga J., Ryszczuk A., Motyl T., (2001), *Biochem. Eng. J.*, 9, 147-154.
34. Jia S., Li P., Park Y. S., Okabe M., (1996), *J. Ferment. Bioeng.*, 82, 191-193.
35. Jia S., Wang M., Kahar P., Park Y. S., Okabe M., (1997), *J. Ferment. Bioeng.*, 84, 176-178.
36. Martin S., Soucaille P., Condoret J.-S., (1995), *Bioproc. Biosyst. Eng.*, 13, 293-300.
37. Jewitt N., Anthony P., Lowe K. C., de Pomerai D. I., (1999), *Enz. Microb. Tech.*, 25, 349-356.
38. Wasanasathian A., Peng C.-A., (2001), *Art. Cell. Blood Subst. Biotech.*, 29, 47-55.
39. Turick C. E., Bulmer D. K., (1998), *Biotech. Lett.*, 20, 123-125.
40. Elibol M., Ozer D., (2000), *Proc. Biochem.*, 36, 325-329.
41. Elibol M., (1999), *Proc. Biochem.*, 34, 557-561.
42. Elibol M., Mavituna F., (1995), *Appl. Microb. Biotech.*, 43, 206-210.
43. Elibol M., (2001), *J. Chem. Tech. Biotech.*, 76, 418-422.
44. Elibol M., Mavituna F., (1997), *Proc. Biochem.*, 32, 417-422.
45. Elibol M., Mavituna F., (1999), *Biochem. Eng. J.*, 3, 1-7.
46. Elibol M., Mavituna F., (1996), *Proc. Biochem.*, 31, 507-512.
47. Okamoto A., Kishine S., Hirosawa T., Nakazono A., (1996), *Plant Cell Rep.*, 15, 731-736.
48. Kanokwaree K., Doran P. M., (1998), *Biotech. Progr.*, 14, 479-486.
49. Wardrop J., Lowe K. C., Power J. B., Davey M. R., (1996), *J. Biotech.*, 50, 47-54.
50. Anthony P., Lowe K. C., Power J. B., Davey M. R., (1997), *Cryobiol.*, 35, 201-208.
51. Lowe K. C., Anthony P., Davey M. R., Power J. B., (2001), *Art. Cell. Blood Subst. Biotech.*, 29, 297-316.
52. Anthony P., Davey M. R., Power J. B., Washington C., Lowe K. C., (1994), *Plant Cell Rep.*, 13, 251-255.
53. Wardrop J., Lowe K. C., Davey M. R., Marchant R., (1997), *Plant Cell Rep.*, 17, 17-21.
54. Malepszy S. (red.), (2001), *Biotechnologia roślin*, PWN, Warszawa.
55. Anthony P., Lowe K. C., Davey M. R., Power J. B., (1997), *Plant Cell Rep.*, 17, 13-16.
56. Gotoh T., Mochizuki G., Kikuchi K.-I., (2001), *Biochem. Eng. J.*, 8, 165-169.

57. Gotoh T., Mochizuki G., Kikuchi K.-I., (2001), *Biochem. Eng. J.*, 7, 69-78.
58. Wang M.-Y., Pulliam T. R., Valle M., Vakharia V. N., Bentley W. E., (1996), *J. Biotech.*, 46, 243-245.
59. Shiba Y., Ohshima T., Sato M., (1998), *Biotech. Bioeng.*, 57, 583-589.