

Paweł SOBIESZUK, Agata STEFANEK, Joanna GRAFFSTEIN, Tomasz CIACH

e-mail: p.sobieszuk@ichip.pw.edu.pl

Zakład Biotechnologii i Inżynierii Bioprocusowej, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Badanie szybkości desorpcji gazów z perfluorodekaliny w warunkach przepływu kapilarnego

Wstęp

Znaczna utrata krwi w wyniku uszkodzenia ciała lub operacji chirurgicznej powoduje zapadanie się naczyń i niewystarczający transport tlenu do narządów i tkanek ciała. Jeśli utrata krwi jest umiarkowana, wewnątrznaczyniową objętość krwi można uzupełnić płynami niezawierającymi nośników tlenu, przykładowo izotonicznym roztworem soli fizjologicznej, roztworem ludzkiej albuminy lub dekstranu. Jeśli utrata krwi jest większa, zmniejszenie zdolności do transportu tlenu przez pozostałe czerwone krwinki musi być zwiększone, w innym przypadku bowiem organy nie będą w stanie podjąć normalnych funkcji. Obecnie w tym celu stosuje się transfuzję krwi pochodzącej od dawców.

Zasoby krwi często nie pokrywają zapotrzebowania ze względu na krótki czas przechowywania, wymagania dotyczące przechowywania, długotrwałe i kosztowne testy w kierunku patogenów i wirusów, dodatkowe testy zgodności przed transfuzją, przeszkody etyczne i religijne. Ponadto transfuzja krwi niesie ze sobą ryzyko hematologicznej reakcji, która może przybrać postać alergii, wstrząsu, a nawet śmierci [Napolitano, 2009], dlatego też opracowanie metody otrzymywania substytutu krwi jest obecnie kluczowym zagadnieniem bioinżynierii.

Syntetyczna krew

Zamienniki krwi spełniające jej podstawową funkcję – przeniesienie tlenu, nazywane dalej substytutami czerwonych krwinek, są przedmiotem intensywnych badań na całym świecie. W pierwszej generacji substytutów czerwonych krwinek, nad którą prace rozpoczęły się 30 lat temu znalazły się emulsje perfluorozwiązków oraz bezkórnokowe, bazujące na hemoglobinie nośniki tlenu. Pierwszą generację substytutów czerwonych krwinek charakteryzują: (a) otrzymywanie syntetyczne (w przypadku perfluorozwiązków), bądź pozyskiwanie z krwi ssaków (w przypadku związków na bazie hemoglobiny), (b) łatwa sterylizacja w celu usunięcia mikroorganizmów i wirusów, (c) brak wymogu testów dopasowania przed transfuzją, (d) wydłużony czas przechowywania oraz mniej restrykcyjne jego wymogi, (e) duże powinowactwo do tlenu oraz szybki jego transport do tkanek.

Hemoglobina pozyskiwana jest z ludzkiej bądź bydłowej krwi, rzadziej przy użyciu genetycznie zmodyfikowanych mikroorganizmów, tj. bakterii czy drożdży [Rabiner i in., 1967]. Szybko okazało się jednak, że stosowanie wyselekcjonowanej hemoglobiny niesie ze sobą poważne skutki uboczne w postaci infekcji i reakcji immunologicznej ze względu na zawartość lipidów pochodzących z membrany zębry erytrocytu, zawierających często bakteryjne endotoksyny.

Perfluorowęgle (PFCs) są syntetycznymi związkami posiadającymi zdolność do rozpuszczania i przenoszenia dużych ilości tlenu. Rozpuszczalność tlenu w PFC jest ponad dwudziestokrotnie większa niż w wodzie [Khattak i in., 2007]. Ponadto perfluorowęgle są całkowicie obojętne biologicznie i są stosowane do przechowywania organów w transplantologii. Niestety, ze względu na to, że nie mieszają się z wodą, nie są w stanie przynieść większości istotnych dla organizmu żywego substancji, m. in. glukozy czy białek. W latach 80. XX wieku zaproponowano użycie stabilizowanych emulsji PFC do zastosowań biomedycznych. *Fluosol-DA* (Green Cross, Inc., Japan) początkowo dopuszczony przez FDA do użycia podczas angioplastyki w 1989 roku, został później wycofany ze względu na niską skuteczność (niska ilość przenieszonego tlenu – 7,2% w porównaniu do 17÷20% dla czerwonych krwinek oraz krótki czas

cyrkulacji 4÷6 h) [Kastro i Briceno, 2010]. Kilka kolejnych produktów zostało wycofanych na etapie badań klinicznych (*Oxyfluor* firmy *HemaGen, Inc.*, USA, *Oxygent*, firmy *Alliance Pharmaceuticals, Inc.*, USA). Pomimo licznych skutków ubocznych Rosja i Meksyk dopuściły do użyciu *Perforan*. Obecnie prowadzone są prace nad produkcją stabilnych nanoemulsji na bazie PFC, co zwiększyłoby czas cyrkulacji w układzie krwionośnym.

W pracy przedstawiono wstępne wyniki badań szybkości desorpcji gazów oddechowych z perfluorodekaliny do czystego azotu. Zastosowano mikroreaktor z przepływem gaz-ciecz, pracujący w reżimie *Taylor*. Ponadto przedstawiono wyniki badań wytwarzania wodnych emulsji perfluorodekaliny z wykorzystaniem surfaktantów.

Badania doświadczalne

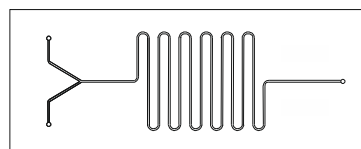
Badano właściwości perfluorodekaliny (PFD) pod kątem nośnika gazów oddechowych (tlenu i dwutlenku węgla). W literaturze tematu spotyka się już liczne artykuły poświęcone absorpcji różnych gazów w perfluorozwiązkach [Sobieszuk i Pilarek, 2012]. Postanowiono zatem zmierzyć szybkość desorpcji CO₂ i O₂ z perfluorodekaliny nasyconej tymi gazami. Są to wstępne badania kinetyczne związane z potencjalnym zastosowaniem PFD jako substytutu czerwonych krwinek.

Ponadto sporządzono emulsje perfluorodekaliny w wodzie z zastosowaniem dwóch surfaktantów: kwasu perfluorooktanosulfonowego (PFOS) i kwasu perfluorobutanosulfonowego (PFBS). Zbadano stabilność emulsji w zależności od ilości użytego surfaktantu oraz porównano stabilność emulsji dla badanych surfaktantów.

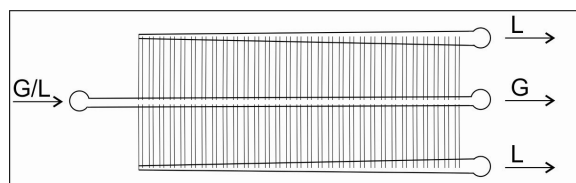
Badania desorpcji

Badano desorpcję tlenu i dwutlenku węgla do czystego azotu z nasyconej odpowiednio O₂ i CO₂ perfluorodekaliny. Pomiar przeprowadzono w mikroreaktorze z przepływem gaz-ciecz, pracującym w reżimie przepływu *Taylor*. Mikroreaktor składał się z jednego mikrokanalu w kształcie meandra. Przekrój mikrokanalu był kwadratowy 0,292×0,292 mm, długość kanału głównego wynosiła 250 mm. Schemat aparatu przedstawiono na rys. 1. Do mikrokanalu podawano czysty azot oraz PFD nasyconą odpowiednim gazem (O₂ lub CO₂). Za mikroreaktorem zastosowano kapilarny rozdzielacz faz (Rys. 2).

W rozdzielaczu ciecz była transportowana przez kapilary ku górze i dołowi, środkiem przepływał gaz. Następnie gaz *on-line* był



Rys. 1. Schemat mikroreaktora



Rys. 2. Kapilarny rozdzielacz faz

dostarczany do chromatografu gazowego firmy Shimadzu GC-2014, w którym możliwa była analiza stężenia tlenu lub dwutlenku węgla w mieszaninie z azotem. Zastosowano przepływ Taylora z następującymi wartościami przepływów: faza gazowa 1,0 ml/min oraz dwie wartości przepływu fazy ciekłej 0,1 i 0,05 ml/min.

W tab. 1 przedstawiono procentową zawartość tlenu w czystym azocie opuszczającym mikroreaktor oraz gęstość strumienia desorbującego gazu, natomiast w tab. 2 procentową zawartość dwutlenku węgla w czystym azocie opuszczającym mikroreaktor oraz gęstość strumienia desorbującego gazu.

Tab. 1. Desorpcja tlenu

| | | |
|---|----------------------|----------------------|
| Przepływ gazu, [ml/min] | 1,0 | 1,0 |
| Przepływ cieczy, [ml/min] | 0,1 | 0,05 |
| Zawartość tlenu, [%] | 2,53 | 2,93 |
| Gęstość strumienia desorbowanego gazu, [$\text{m}^3 \text{O}_2/\text{m}^2\text{s}$] | $2,30 \cdot 10^{-4}$ | $2,66 \cdot 10^{-4}$ |

Tab. 2. Desorpcja dwutlenku węgla

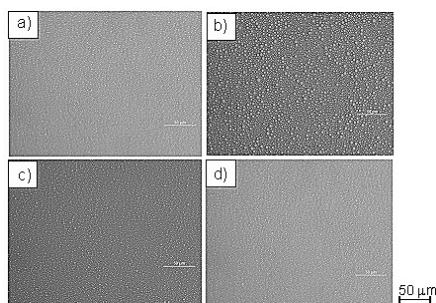
| | | |
|--|----------------------|----------------------|
| Przepływ gazu, [ml/min] | 1,0 | 1,0 |
| Przepływ cieczy, [ml/min] | 0,1 | 0,05 |
| Zawartość dwutlenku węgla, [%] | 2,0 | 2,13 |
| Gęstość strumienia desorbowanego gazu, [$\text{m}^3 \text{CO}_2/\text{m}^2\text{s}$] | $1,82 \cdot 10^{-4}$ | $1,94 \cdot 10^{-4}$ |

Trudno jest oszacować warunki desorpcji tlenu, jaka zachodzi w komórkach. Jest to niewątpliwie desorpcja do cieczy. Przy wydechu dwutlenek węgla desorbuje się w płucach do gazu. Średnio dorosły człowiek wykonuje 16 wdechów i wydechów na minutę, przy średniej objętości gazu około 400 ml. Średnio w wydychanym powietrzu znajduje się 20 ml CO_2 , powierzchnia płuc jest rzędu 3,3 m^2 . Na podstawie powyższych danych można oszacować, że gęstość desorbowanego w płucach dwutlenku węgla wynosi: $1,6 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3 \text{CO}_2/\text{m}^2\text{s}$. Szybkość desorpcji dwutlenku węgla obserwowana w przepływie Taylora w mikroreaktorze (Tab. 2) jest o dwa rzędy wielkości większa. Wydaje się zatem, że perfluorodekalina jako substytut czerwonych krwinek jest właściwym nośnikiem CO_2 .

Badania stabilności emulsji PFD

Sporządzono emulsje PFD w wodzie z dodatkiem dwóch surfaktantów: PFOS i PFBS. Emulsje o składzie podanym w tab. 3 sporządzano przez rozpuszczenie danej ilości surfaktantu w wodzie, dodanie PFD i sonifikację ultradźwiękową przy użyciu sonifikatora Hielscher 4P 100H przez 10 minut przy częstotliwości 60 kHz.

Próbki przygotowywane były w objętości 5 ml. Na każdym etapie przygotowywania emulsji kontrolowano pH. Próbki podczas sonifikacji umieszczane były w lodzie. Emulsje oceniane były jakościowo pod mikroskopem optycznym Nikon Ti-U przy powiększeniu x400. Zdjęcia wykonanych emulsji zaprezentowano na rys. 3. Stabilność wykonanych emulsji oceniano po 24 h przechowywania w temperaturze 4 °C przez obserwację pod mikroskopem. Zdjęcia emulsji po 24 h przechowywania przedstawiono na rys. 4. Emulsje sporządzone w toku eksperymentów były jednorodne i homogeniczne.



Rys. 3. Zdjęcia mikroskopowe sporządzonych emulsji (Składy emulsji podano w tab. 3)

Tab. 3. Składy zbadanych emulsji

| Surfaktant | Zawartość surfaktantu, [% mas.] | Zawartość PFD | | Widok emulsji na rys. |
|------------|---------------------------------|---------------|----------|-----------------------|
| | | [% obj.] | [% mas.] | |
| PFOS | 0,001 | 2 | 3,82 | 3a, 4a |
| PFOS | 0,005 | 2 | 3,82 | 3b, 4b |
| PFBS | 0,001 | 2 | 3,82 | 3c, 4c |
| PFBS | 0,005 | 2 | 3,82 | 3d, 4d |

Średnica miceli fazy rozproszonej bezpośrednio po wykonaniu emulsji nie przekraczała około 2 μm w przypadku stosowania PFOS i około 5 μm w przypadku stosowania PFBS. Emulsje wykonane z dodatkiem PFOS odznaczały się znacznie większą stabilnością po 24 h inkubacji w 4°C, faza rozproszona emulsji z dodatkiem PFBS ulegała znacznej koalescencji (Rys. 4). Przyczyną tego zjawiska jest fakt, iż PFOS posiada dłuższe łańcuchy węglowodorowe, które jako część hydrofobowa znacznie lepiej kotwiczą się w hydrofobowej perfluorodekalinie. Niestety PFOS odznacza się bardzo dużą cytotoxycznością, co wyklucza go z zastosowania jako składnik substytutu czerwonych krwinek.

Wnioski

W pracy przedstawiono wstępne badania zastosowania perfluorodekaliny (PFD) jako substytutu krwi. Wyniki badań kinetycznych desorpcji gazów oddechowych z PFD w warunkach przepływu kapilarnego potwierdziły trafność wyboru substancji będącej ich nośnikiem.

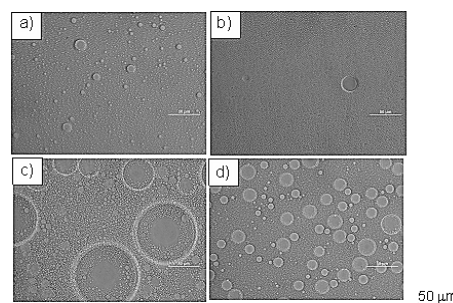
Zaprezentowano również wyniki prac dotyczące wytwarzania emulsji PFD- H_2O z dodatkiem surfaktantów, badania stabilności uzyskanych emulsji oraz wnioski dotyczące zastosowanego surfaktantu.

Dalsze prace zastosowania PFD jako składnika syntetycznej krwi dotyczyć będą badań właściwości desorpcyjno-absorpcyjnych perfluorodekaliny w postaci wodnej emulsji podczas przepływu kapilarnego.

LITERATURA

- Castro C.I., Briceno J.C., 2010. Perfluorocarbon-based oxygen carriers: review of products and trials. *Artif. Organs*, **34**, 622–634. DOI: 10.1111/j.1525-1594.2009.00944.x.
- Khattak S. F., Chin K. S., Bhatia S. R., Roberts S. C., 2007. Enhancing oxygen tension and cellular function in alginate cell encapsulation devices through the use of perfluorocarbons. *Biotech. Bioeng.*, 2007, **96**, 156-166. DOI: 10.1002/bit.21151
- Napolitano L.M., 2009. Hemoglobin-based oxygen carriers: first, second or third generation? Human or bovine? Where are we now? *Crit. Care Clin.* **25**, 279–301. DOI: 10.1016/j.ccc.2009.01.003
- Rabiner S.F., Helbert J.R., Lopas H., Friedman L. H., 1967. Evaluation of stroma-free hemoglobin as a plasma expander. *J. Exp. Med.*, **126**, 1127-1142
- Sobieszuk P., Pilarek M., 2012. Absorption of CO_2 into perfluorinated gas carrier in the Taylor gas-liquid flow in a microchannel system, *Chem. Proc. Eng.*, **33**, 595-602. DOI: 10.2478/v10176-012-0049-3

Praca była finansowana przez Narodowe Centrum Nauki, w konkursie PRELUDIUM, nr DEC-2014/13/N/ST8/00098



Rys. 4. Zdjęcia mikroskopowe sporządzonych emulsji po 24 h przechowywania (Składy emulsji podano w tab. 3)