

УДК 502.6:631.618:631.86

**Теория и практика использования перфторуглеродов «голубой крови» при глубинном культивировании биодеструкторов**

© 2010. М. К. Бакулин, д.м.н., профессор, С. В. Дармова, аспирант,  
**В. М. Бакулин, к.т.н., н.с.,**  
 Вятский государственный университет,  
 e-mail: ВМК953@mail.ru

В обзоре рассматриваются теория и практика использования перфторуглеродов (ПФУ) при глубинном выращивании культур биодеструкторов. Показано, что кроме способности к транспорту газов, ПФУ обладают еще рядом уникальных для биотехнологии микроорганизмов свойств: химической устойчивостью и отсутствием токсичности для прокариот и эукариот, способностью модифицировать клеточные мембраны, улучшать транспорт питательных веществ. Добавление в среду ПФУ обеспечивает существенное увеличение скорости роста биодеструкторов, утилизации ксенобиотиков, фиксации азотобактером молекулярного азота на синтетической среде и многократное повышение выхода целевого продукта.

The investigation deals with theory and practical use of perfluorocarbons (PFU) for deep cultivation of biodestructors' cultures. It is shown that in addition to ability to transport gases, PFU possess a number of characteristics unique for biotechnology: chemical stability, absence of toxicity for eukaryotic and prokaryotic microorganisms, ability to modify cells' membranes, improve nutritious substances transporting. Addition of PFU to the medium provides a considerable increase of growth rate of biodestructors, utilization of xenobiotics, fixing molecular nitrogen by means of azotobacter in the synthetic media and repeated increase of the ultimate product output.

**Ключевые слова:** перфторуглероды (ПФУ), «голубая кровь», биотехнология, микроорганизмы, биодеструкторы, глубинное культивирование

**Key words:** perfluorocarbons (PFU), «blue blood», biotechnology, microorganisms, biodestructors, deep cultivation

Разработка кровезаменителей на основе эмульсий перфторуглеродов (ПФУ) с газотранспортной функцией почти одновременно началась в разных странах в конце 60-х начале 70-х гг. XX столетия. Перечень основополагающих в этом направлении публикаций включает работы, принадлежащие Л. Кларку (L. Clark), Р. Гейеру (R. Geyer), Ф. Голлану (F. Gollan), Р. Найто (R. Naito), К. Якояме (K. Yokoyama) [1 – 3].

В нашей стране исследования по созданию кровезаменителей такого рода стали возможными в 70 гг. XX столетия, когда «группа химиков-фтороргаников под руководством академика Ивана Людвиговича Кнунянца стала искать медико-биологическое приложение своей продукции» [цит. по 4]. Эти поиски вылились в крупномасштабную программу «Перфторуглероды в биологии и медицине», к которой были привлечены 40 академических институтов и предприятий СССР. Программу возглавили биофизик Г. Р. Иваницкий, врач Ф. Ф. Белоярцев и химик И. Л. Кнунянц. В 1982 г. отечественный препарат был разработан и получил название перфторан. Это – эмульсия, имеющая на

просвет голубоватый оттенок, который связан с рассеянием белого света малыми частицами (средний размер 70 нанометров) перфторуглеродов. Поэтому в средствах массовой информации перфторан получил название «голубая кровь», а его газотранспортные компоненты – перфторуглероды (ПФУ) названы «голубыми алмазами перфторана» [5].

В этот же период в результате работ учёных разных стран с использованием перфторуглеродов был создан целый ряд кровезаменителей с газотранспортной функцией: Oxygent, Liqui Vent, Therox, Oxyfluor (США); Fluosol-DA (Япония); Emulsion II (Китай) [6, 7]. Следует отметить, что, несмотря на превосходство перфторана по своим характеристикам над зарубежными аналогами, его ожидала длительная и трагическая борьба с чиновниками от науки и многочисленными недругами, не желающими верить в отечественный препарат. Трагическая история разработки перфторана была описана во многих научных изданиях, средствах массовой информации, в том числе и в журнале «Nature» [8, 9]. В конечном итоге препарат всё-таки был зарегистрирован Фармкомитетом России в 1995 г.,

и ещё через два года Министерством здравоохранения России была выдана лицензия разработчикам препарата на его массовое производство. Необходимо отметить, что сочетание уникальной отечественной технологии получения кровезаменителя и свойства наночастиц (размер эритроцита крови человека в сто раз превышает средний размер ПФУ-частиц перфторана) перфторуглеродов в эмульсии, сделало российский препарат непревзойдённым по своей лечебной эффективности среди лучших мировых аналогов. Перфторан зарекомендовал себя в качестве исключительно полезного препарата в Центре медицины катастроф Кузбасса при спасении шахтёров. Руководитель этого Центра – профессор Ильгиз Галеев – в интервью автору статьи [10] отмечает, что «именно кровезаменитель, а не кровь были нужны в первую очередь на месте трагедии во время пожара в «Хромой лошади» ... и, если бы, пострадавшим при террористическом акте в «Норд Осте» и во многих других местах, где была нужна скорая помощь и «где кровь не могла идти в лёгкие» из-за угарного или других газов, баротравм или ожогов, «...экстренно был введён перфторан, многих удалось бы спасти!». Однако, несмотря на многочисленные положительные отзывы и заключения отечественных и зарубежных специалистов о высокой эффективности этой уникальной разработки Российских учёных, признающих перфторан лучшим среди аналогов этого рода, он остаётся до наших дней на правах «Золушки» в Министерстве здравоохранения и социального развития РФ и Федеральном медико-биологическом агентстве.

Следует отметить, что исследования, проведённые при разработке кровезаменителей типа перфторана, подняли новые пласты научных данных, свидетельствующих о широких возможностях применения ПФУ в различных областях медицины: кардиологии, пульмонологии, гематологии, гепатологии, травматологии, трансплантологии, онкологии, иммунологии, при шоковых состояниях различного генеза, токсикологии и многих других [11 – 13]. Достойное применение перфторуглероды находят и при производстве косметических средств. Так, компания Faberlic включает в них, кроме эксклюзивных биологически-активных добавок, уникальную эмульсию «Аквафтем», которая представляет собой эмульгированные перфторуглероды, обеспечивающие доставку молекулярного кислорода в глубокие слои кожи [14, 15].

К сожалению, в период разработки перфторана, а тем более в последние годы область изучения ПФУ была и остаётся сугубо медицинской. Существенно сдерживает расширение областей применения ПФУ то, что научная литература по соединениям этого класса и механизмам их действия является библиографической редкостью и доступна в настоящее время ограниченному кругу учёных. Об этом свидетельствует тот факт, что 99% всех научных публикаций в этой области имеют исключительно клиническую направленность. Такое сужение направленности исследований перфторуглеродов лишь областью медицины и созданием кровезаменителей существенно обедняет результативность и возможности их использования для практических нужд. Вне внимания учёных осталась такая обширная область приложения перфторуглеродов, как биотехнология.

Как показали результаты исследований, проведённых сотрудниками Вятского государственного университета, главному объекту биотехнологии – микроорганизмам – тоже нужна «голубая кровь» [16 – 21].

Кровь – жидкая «ткань», осуществляющая в организме транспорт химических веществ (в т. ч. кислорода), благодаря которому происходит интеграция биохимических процессов, протекающих в различных клетках и межклеточных пространствах, в единую систему» [22]. Если провести аналогию этого определения, приведённого в медицинской энциклопедии, с глубинным культивированием микроорганизмов, то по своей сути, кровь является той культуральной средой, в которой размножаются, живут, развиваются и выполняют свои функции клетки макроорганизма. Кровь выполняет газотранспортную, защитную, терморегуляторную, питательную, гомеостатическую и другие функции. Несмотря на выполнение многих функций в организме газотранспортная или дыхательная функция поставлена при описании физиологии крови на первое место. Транспорт газов, осуществляемый кровью, представляет сложную уникальную систему обеспечения каждой клетки макроорганизма кислородом и удаления газообразных продуктов метаболизма.

Многим микроорганизмам (прокариотам и эукариотам) жизненно необходим кислород [5]. Он непосредственно участвует в различных биохимических реакциях, обеспечивающих процессы жизнедеятельности микробов. Кислород является важнейшим элементом, используемым микроорганизмами для построения структурных компонентов микробной

клетки и получения энергии, его доля в сухом веществе клетки составляет 30–35%, в активных вегетативных клетках его содержание за счёт кислорода воды, углеводов, липидов, белков, нуклеиновых кислот достигает 82–90%.

Кислород поступает в клетки в составе воды, диоксида углерода и органических соединений. Кроме того, он содержится в CO<sub>2</sub> и многих органических соединениях. Однако подавляющему большинству используемых в биотехнологии микроорганизмов крайне необходим молекулярный кислород (O<sub>2</sub>). Кислород является наиболее реакционноспособным компонентом воздуха. Сухой воздух у поверхности Земли содержит 78,1% азота, 20,9% кислорода, 0,03% углекислого газа, 1% инертных газов, но не все микроорганизмы обладают способностью ассимилировать кислород из воздуха, они потребляют кислород, растворённый в воде, питательных средах и других субстратах. Главная функция O<sub>2</sub> состоит в том, что он служит конечным акцептором электронов при аэробном дыхании. При этом O<sub>2</sub> восстанавливается до воды. В структурные компоненты клетки атомы кислорода включаются только в том случае, если источниками углерода служат метан, углеводороды с длинной цепью или ароматические углеводороды [23].

Изучение потребности микроорганизмов в кислороде началось с открытия Луи Пастером факта использования кислорода дрожжами для окисления источников углерода и энергии. Количественное исследование этого явления началось в первой половине XX века с внедрением инструментальных методов контроля интенсивности дыхания и стехиометрии окисления субстрата. С середины прошлого столетия, с развитием глубинного культивирования разнообразных микробов, проблема обеспечения глубинных культур кислородом стала одной из основных при разработке управляемого выращивания микроорганизмов [24].

При выращивании микроорганизмов в промышленных условиях обеспечение кислородом (или его удаление для анаэробов) является одним из важнейших факторов, определяющих продуктивность процесса накопления биомассы.

Присутствующие в питательных средах растворённые вещества (сахара, минеральные соли и др.), как правило, уменьшают растворимость кислорода. Для микроорганизмов, растущих на агаре или в тонких слоях жидкости в присутствии воздуха, кислорода обычно достаточно. В жидких средах при большом объёме жидкости аэробные микроорганизмы мо-

гут расти только на поверхности, так как в более глубоких слоях по мере удаления от поверхности условия приближаются к анаэробным. Для нормального роста аэробных микроорганизмов в глубоких слоях жидкой культуры требуется аэрация. Литр воды при 20°C и нормальном атмосферном давлении содержит всего лишь 6,2 мл или 0,28 ммоль кислорода. Такого количества достаточно для окисления не более 0,046 ммоль или 8,3 мг глюкозы (т. е. примерно одной тысячной общего количества глюкозы, содержащейся в обычных питательных средах). Поэтому в среде невозможно создать значительный запас O<sub>2</sub> и его приходится добавлять в жидкую среду непрерывно.

Для аэрации жидких культур используются либо обычным воздухом, либо смесью кислорода, азота и диоксида углерода. Потребление кислорода микроорганизмами зависит от индивидуальных особенностей культуры, состава среды, физиологической активности клеток, фазы развития популяции, концентрации кислорода в среде. Скорость перехода молекулярного кислорода в раствор возрастает с повышением парциального давления и с увеличением поверхности раздела между газовой и жидкой фазами. Необходимость своевременного и качественного обеспечения микробных клеток кислородом при глубинном культивировании заставляет биотехнологов прибегать к разнообразным дорогостоящим ухищрениям, которые, однако, не обеспечивают во многих случаях равномерное и полноценное снабжение всей популяции микробов кислородом и удаление отработанных газообразных продуктов из среды.

Мы подошли к решению проблемы улучшения транспорта газов в глубинных культурах микроорганизмов с нетривиальной позиции, а именно, – используя общие закономерности процессов обеспечения клеток и тканей организма человека с помощью крови для решения вопросов снабжения кислородом культивируемых микробов с помощью аналогов крови с газотранспортной функцией на основе перфторорганических соединений [16].

Результаты исследований показали, что при культивировании эукариотных и прокариотных микроорганизмов, являющихся источниками различных биологических продуктов, и обладающих более интенсивным обменом, чем организмы человека и животных, и, следовательно, повышенной потребностью в кислороде, весьма эффективно применение перфторуглеродов. По-видимому, ПФУ не только обеспечивает увеличение концентрации кислорода в среде, но и улучшает достав-

ку его клеткам, модифицирует клеточные мембраны, стимулируя транспорт питательных веществ и газовый обмен у микроорганизмов в глубинных культурах [16 – 21].

Перфторорганические соединения (ПФОС) отличаются высокой устойчивостью к действию физических и химических факторов; отсутствием токсичности для одноклеточных и многоклеточных организмов в широком диапазоне концентраций в среде; большой способностью растворять газы, доставлять их клеткам и тканям; модифицировать клеточные мембраны; ускорять процессы массопереноса; улучшать метаболизм клеток и скорость их роста. Так, внесение в жидкую питательную среду перфтордекалина, карбогала, перфторметилдекалина или «Перфторана» – кровезаменителя, содержащего в своём составе перфтордекалин и перфторметилциклогексилпиперидин, приводило к повышению уровня продукции микроорганизмами антибиотиков, скорости их роста, утилизации ими ксенобиотиков.

Нами было проведено культивирование микроорганизмов прокариотов, относящихся к энтеробактериям, псевдомонадам, бациллам, актиномицетам, цианобактериям, ярривиям, родококкам, и эукариотов, относящихся к простейшим и микромицетам, при этом было показано, что добавление в среду ПФУ с газотранспортной функцией во многих случаях значительно ускоряет рост и развитие микроорганизмов в разных условиях культивирования.

С точки зрения экологии особый интерес представляют исследования, проведённые с биодеструкторами нефтепродуктов. К биодеструкторам нефтепродуктов относят значительное число микроорганизмов – представителей разных таксономических групп: псевдомонад, бацилл, родококков, микобактерий, микромицетов и других микробов, которые выращивают в производственных условиях для интродукции в контаминированную нефтью среду [25, 26].

Результаты многочисленных лабораторных и полевых исследований процессов микробной деструкции углеводородов нефти и сопряжённых с ними процессов трансформации углеводородов в загрязнённых нефтепродуктами почвах показали, что активность углеводородокисляющих микроорганизмов находится в прямой зависимости от интенсивности аэрации почвы или культуральной среды, обеспечивающей поступление с воздухом из атмосферы кислорода и азота, и активности связывания последнего азотфиксирующими бактериями [25 – 27]. Азотсодержащие минеральные удобрения (аммиачная селитра, азофос

и др.), традиционно применяемые для рекультивации земель нефтезагрязнённых районов в средних дозах от 500 до 1000 кг/га, приводят к подавлению функционирования аборигенной азотфиксирующей микрофлоры, инактивации процессов биологической азотфиксации в почвах сельскохозяйственных угодий и к значительным потерям азота минеральных удобрений в результате усиления процессов денитрификации [27].

Для улучшения транспорта кислорода и снабжения им клеток микроорганизмов-нефтедеструкторов в культуральных средах, содержащих высокие концентрации углеводородов нефти и нефтепродуктов, было предложено вносить в них различные концентрации жидких перфторорганических соединений (ПФОС) с газотранспортной функцией и других переносчиков кислорода [27 – 29].

Результаты проведённых экспериментов свидетельствовали о перспективности использования перфтордекалина (в меньшей степени карбогала) для получения биомассы микроорганизмов – биодеструкторов нефти в ассоциации с азотфиксирующими бактериями. При этом возможно использование более дешёвой синтетической среды со сниженной более чем в 20 раз концентрацией азотсодержащего компонента (однозамещенного фосфорнокислого аммония), обычно применяемого для выращивания нефтедеструкторов на синтетических средах с нефтью. Использование ПФУ способствовало возрастанию нитрогеназной активности азотобактера и увеличению количества фиксированного из воздуха азота. Показана возможность существенной интенсификации биодеструктивной активности грамположительных и грамотрицательных бактерий из разных таксономических групп, а также микромицетов рода *Fusarium* в комбинации с азотобактером при добавлении в среду культивирования перфтордекалина и карбогала [20 – 28].

Результаты исследований, показали, что с помощью перфторуглеродов, обладающих газотранспортной функцией, возможно решение общих и частных вопросов микробиологического синтеза физиологически активных веществ, создания новых систем микробиологической деградации экотоксикантов, производства разнообразных биопрепаратов.

Не надо быть большим пророком, чтобы предвидеть в ближайшее десятилетие прорыв в применении перфторуглеродов именно в области биотехнологии, основанной на глубинном культивировании культур микроорганизмов. Относительная дороговизна ПФУ стори-

цей окупится результатами их применения в различных областях промышленной биотехнологии и экобиотехнологии.

### Литература

1. Clark L. Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure // *Science*. 1966. V. 152. № 3730. P. 1755–1756.
2. Geyer R.P. Fluorocarbon artificial blood substitutes // *New Engl. J. Med.* 1973. V. 289. P. 1077–1082.
3. Naito R. On the perfluorodecalin – phospholipid emulsion as the red cell substitute // *Proc. X-th Int. Congr. Nutz-Symp. Perfluorochemical Artificial Blood*. Kyoto. 1975. P. 55–72.
4. Иваницкий Г.Р. Дар жизни или поцелуй смерти // *Вестник РАН*. 1999. № 3. С. 273–276.
5. Иваницкий Г.Р. Биофизика на пороге нового тысячелетия: перфторуглеродные среды и газотранспортные кровезаменители // *Биофизика*. 2001. Т. 46. № 1. С. 5–33.
6. Иваницкий Г.Р. Биофизические основы создания перфторуглеродных сред и газотранспортных кровезаменителей (обзор) // *Перфторорганические соединения в биологии и медицине*. Пуццино. 2001. С. 4–48.
7. Иваницкий Г.Р. Переливание крови: против, за и альтернатива // *Наука и жизнь*. 1999. № 2. С. 14–19.
8. Rich V. Scandal over Soviet artificial blood research project // *Nature*. 1988. V. 335. № 6186. P. 107.
9. Маевский, Е.И. О некоторых проблемах внедрения наукоемких продуктов на примере истории препарата перфторан // *Перфторуглеродные соединения в медицине и биологии: Материалы XIII Международной конференции*. Пуццино. 2004. С. 32–48.
10. Попова Н. «Кислородная подушка» для углекислого газа // *Аргументы недели*. 2010. № 211. С. 10–11.
11. Артамонова В.С. Эпоха перфторуглеродов // *Химия и жизнь – XXI век*. 1998. № 7. С. 14–19.
12. Богданова Л.А., Маевский Е.И., Иваницкий Г.Р., Пушкин С.Ю., Аксенова О.Г. Краткий обзор применения перфторана в клинике // *Перфторуглеродные соединения в медицине и биологии: Материалы XIII Международной конференции*. Пуццино. 2004. С. 18–32.
13. Жукаускас Г.Ю., Дапшис К.Л. Многофункциональное применение перфторуглеродов // *Физиологически активные вещества на основе перфторуглеродов в экспериментальной и клинической медицине*. С.-Петербург: ВМА, 2001. С. 18–20.
14. Краснова В. Российская компания решила создать косметический брэнд мирового класса. Для этого ей понадобился инновационный продукт и техника сетевого маркетинга // *Эксперт*. 2002. № 20. С. 26–34.
15. Faberlic – кислородная косметика. Каталог компании Faberlic. 2002. 40 с.
16. Бакулин М.К., Кучеренко А.С., Золотарев А.Г., Кривошеина Н.А. Нужна ли «голубая кровь микроорганизмам»? // *МВФ. Медицина. Фармация*. 2003. № 2. С. 7–11.
17. Бакулин М.К., Кучеренко А.С., Бакулина Л.В., Шведов В.В. Влияние перфторорганических соединений на рост стрептомицетов и биосинтез ими антибиотика даунорубицина // *Антибиотики и химиотерапия*. 2003. Т. 48. № 12. С. 5–8.
18. Бакулин М.К., Захаров В.Ю., Чеботарев Е.В. Интенсификация биodeградации нефти и нефтепродуктов под влиянием перфтордекалина // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2004. Т. 40. № 3. С. 317–322.
19. Бакулин М.К., Дармов И.В., Кучеренко А.С., Бакулина Л.В. «Голубая кровь» в биотехнологии глубинного выращивания культур бактерий на синтетической среде с нефтью // *Биотехнология*. 2004. № 3. С. 55–62.
20. Бакулин М.К., Чеботарев Е.В., Кучеренко А.С. Использование перфторуглеродов для интенсификации микробной деградации ксенобиотиков на примере нефти и нефтепродуктов // *Перфторуглеродные соединения в медицине и биологии: Материалы XIII Международной конференции*. Пуццино. 2004. С. 175–186.
21. Бакулин М.К., Дармов И.В., Кучеренко А.С., Грудцына А.С., Плетнёва А.Ю. Интенсификация скорости роста бактерий и микромицетов в глубинных культурах под влиянием перфторорганических соединений // *Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы II Московского международного конгресса в 2 ч*. Москва. 2003. Ч. 1 С. 317–318.
22. Балаховский И.С., Борисов, Мовшев Б.Е. *Кровь: Большая медицинская энциклопедия*. М.: Изд-во: Сов. Энциклопедия, 1980. Т. 12. С. 93–132.
23. *Промышленная микробиология* / Под ред. Н.С. Егорова. М.: Высш. школа, 1989. 688 с.
24. Шлегель Г.Г. *Общая микробиология* М.: Мир. 1987. 568 с.
25. Киреева Н.А. *Микробиологические процессы в нефтезагрязненных почвах Уфа: Изд-во БашГУ*. 1995. 172 с.
26. Габбасова И.М., Сулейманов Р.Р., Бойко Т.Ф., Галимзянова Н.Ф. Использование биогенных добавок совместно с препаратом «Деворойл» для рекультивации нефтезагрязненных почв // *Биотехнология*. 2002. № 2. С. 57–65.
27. Терещенко Н.Н., Лушников С.В., Пышьева Е.В. Биологическая азотфиксация как фактор ускорения микробной деструкции нефтяных углеводородов в почве и способы ее стимулирования // *Биотехнология*. 2004. № 5. С. 69–79.
28. Бакулин М.К., Плетнева А.Ю., Грудцына А.С. Биологическая фиксация азота и рост бактерий рода *Azotobacter* в жидких средах в присутствии перфторуглеродов // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2007. Т. 43. № 4. С. 443–449.
29. Бакулин М.К., Плетнева А.Ю., Грудцына А.С. Медико-биологические аспекты использования перфторуглеродов с газотранспортной функцией в медицине и ветеринарии // *Ветеринарная медицина*. 2006. № 2–3. С. 25–27.