**Курсовая работа на тему**

**Искусственная кровь или кровезаменители. Их создание и использование в медицине**

**Содержание**

Введение

1. Кровь – жидкая ткань организма. Функции крови
2. Переливание естественной донорской крови. Методика и трудности.
3. Необходимость создания искусственной крови.
4. Гемоглобиновые кровезаменители. Разработки и испытания.
5. Перфторуглероды – альтернатива гемоглобину. Их использование для создания кровезаменителей.
6. Получение эмульсий на основе перфторуглеродов. Перфторан.
7. Перспективы и новейшие технологии.

Заключение

**Введение**

Основная цель этой работы – показать, что развитие биотехнологии в 21 веке вышло на новый уровень. Ученые из разных стран продолжают искать пути решения проблем, связанных с разработкой и функционированием кровезаменителей. Предлагаются различные пути решения, компании объединяют свои усилия, чтобы добиться нужных результатов. Пока еще не создан универсальный препарат, который мог бы выполнять все, или хотя бы большинство функций крови, и вместе с этим быть максимально приближенным по свойствам к естественной ткани. Однако создание такого кровезаменителя не за горами, а пока существуют уже готовые препараты, которые отчасти могут восполнять недостающий объем крови и выполнять некоторые ее функции, а значит, и помогать огромному количеству людей справляться с различными травмами и болезнями

1. **Кровь – жидкая ткань организма. Функции крови**

Кровь – жидкая соединительная ткань, среда, которая отражает условия возникновения жизни в далекие времена, т.е. водную среду (пресная и морская вода). В условиях наземного существования эта среда стала внутренней, и в ходе филогенеза животных ее химический состав значительно изменился.

В организме человека кровь составляет 1\11 – 1\13 (приблизительно 7 %) массы тела. Объем крови взрослого мужчины составляет примерно 75 мл на килограмм веса тела; у взрослой женщины этот показатель равен примерно 66 мл. Соответственно общий объем крови у взрослого мужчины – в среднем около 5 л; более половины объема составляет плазма, а остальная часть приходится в основном на эритроциты.

Кровь состоит из плазмы (прозрачной жидкости бледно-желтого цвета) и взвешенных в ней клеточных элементов. Плазма крови состоит из воды, белков, липидов, углеводов и газов. Воды в плазме содержится около 90 %, белков 7%. Из общего количества белков различают сывороточные альбумины, сывороточные глобулины и фибриноген. К форменным элементам крови относятся эритроциты, лейкоциты, представленные гранулоцитами (нейтрофильные, эозинофильные и базофильные гранулоциты) и агранулоцитами (лимфоциты и моноциты), а также тромбоциты – кровяные пластинки. Красный цвет крови определяется наличием в эритроцитах красного пигмента гемоглобина. В артериях, по которым кровь, поступившая в сердце из легких, переносится к тканям организма, гемоглобин насыщен кислородом и окрашен в ярко-красный цвет; в венах, по которым кровь притекает от тканей к сердцу, гемоглобин практически лишен кислорода и темнее по цвету.

С кровью и кровоснабжением тесно связаны практически все процессы, имеющие отношение к пищеварению и дыханию – двум функциям организма, без которых жизнь невозможна. Связь с дыханием выражается в том, что кровь обеспечивает газообмен в легких и транспорт соответствующих газов: кислорода – от легких в ткани, диоксида углерода (углекислого газа) – от тканей к легким. Транспорт питательных веществ начинается от капилляров тонкого кишечника; здесь кровь захватывает их из пищеварительного тракта и переносит во все органы и ткани, начиная с печени, где происходит модификация питательных веществ (глюкозы, аминокислот, жирных кислот), причем клетки печени регулируют их уровень в крови в зависимости от потребностей организма (тканевого метаболизма). Переход транспортируемых веществ из крови в ткани осуществляется в тканевых капиллярах; одновременно в кровь из тканей поступают конечные продукты, которые далее выводятся через почки с мочой (например, мочевина и мочевая кислота. Кровь переносит также продукты секреции эндокринных желез – гормоны – и тем самым обеспечивает связь между различными органами и координацию их деятельности.

Кровь играет ключевую роль в поддержании постоянной температуры тела у гомойотермных, или теплокровных, организмов. Температура человеческого тела в нормальном состоянии колеблется в очень узком интервале около 37° С. Выделение и поглощение тепла различными участками тела должны быть сбалансированы, что достигается переносом тепла с помощью крови. Центр температурной регуляции располагается в гипоталамусе – отделе промежуточного мозга. Этот центр, обладая высокой чувствительностью к небольшим изменениям температуры проходящей через него крови, регулирует те физиологические процессы, при которых выделяется или поглощается тепло. Один из механизмов состоит в регуляции тепловых потерь через кожу посредством изменения диаметра кожных кровеносных сосудов кожи и соответственно объема крови, протекающей вблизи поверхности тела, где тепло легче теряется. В случае инфекции определенные продукты жизнедеятельности микроорганизмов либо продукты вызванного ими распада тканей взаимодействуют с лейкоцитами, вызывая образование химических веществ, стимулирующих центр температурной регуляции в головном мозге. В результате наблюдается подъем температуры тела, ощущаемый как жар.

В осуществлении функции защиты организма от повреждений и инфекции особую роль играют лейкоциты двух типов: полиморфноядерные нейтрофилы и моноциты. Они устремляются к месту повреждения и накапливаются вблизи него, причем большая часть этих клеток мигрирует из кровотока через стенки близлежащих кровеносных сосудов. К месту повреждения их привлекают химические вещества, высвобождаемые поврежденными тканями. Эти клетки способны поглощать бактерии и разрушать их своими ферментами. Таким образом, они препятствуют распространению инфекции в организме. Лейкоциты принимают также участие в удалении мертвых или поврежденных тканей. Процесс поглощения клеткой бактерии или фрагмента мертвой ткани называется фагоцитозом, а осуществляющие его нейтрофилы и моноциты – фагоцитами.

В борьбе с инфекцией важная роль принадлежит белкам плазмы, а именно иммуноглобулинам, к которым относится множество специфических антител. Антитела образуются другими типами лейкоцитов – лимфоцитами и плазматическими клетками, которые активируются при попадании в организм специфических антигенов бактериального или вирусного происхождения (либо присутствующих на клетках, чужеродных для данного организма). Выработка лимфоцитами антител против антигена, с которым организм встречается в первый раз, может занять несколько недель, но полученный иммунитет сохраняется надолго. Хотя уровень антител в крови через несколько месяцев начинает медленно падать, при повторном контакте с антигеном он вновь быстро растет. Это явление называется иммунологической памятью. При взаимодействии с антителом микроорганизмы либо слипаются, либо становятся более уязвимыми для поглощения фагоцитами. Кроме того, антитела мешают вирусу проникнуть в клетки организма хозяина.

1. **Переливание естественной донорской крови. Методика и трудности**

С конца 1930-х годов переливание крови или ее отдельных фракций получило широкое распространение в медицине, особенно в военной. Основная цель переливания крови (гемотрансфузии) – замена эритроцитов больного и восстановление объема крови после массивной кровопотери. Последняя может произойти либо спонтанно (например, при язве двенадцатиперстной кишки),либо в результате травмы, в ходе хирургической операции или при родах. Переливание крови применяют также для восстановления уровня эритроцитов при некоторых анемиях, когда организм теряет способность вырабатывать новые кровяные клетки с той скоростью, какая требуется для нормальной жизнедеятельности. Общее мнение авторитетных медиков таково, что переливание крови следует производить только в случае строгой необходимости, поскольку оно связано с риском осложнений и передачи больному инфекционного заболевания – гепатита, малярии или СПИДа.

Первоначальные методы прямого переливания крови от донора реципиенту отошли в прошлое. Сегодня донорскую кровь берут из вены в стерильных условиях в специально подготовленные емкости, куда предварительно внесены антикоагулянт и глюкоза (последняя – в качестве питательной среды для эритроцитов при хранении). Из антикоагулянтов чаще всего используют цитрат натрия, который связывает находящиеся в крови ионы кальция, необходимые для свертывания крови. Жидкую кровь хранят при 4° С до трех недель; за это время остается 70% первоначального количества жизнеспособных эритроцитов. Поскольку этот уровень живых эритроцитов считается минимально допустимым, кровь, хранившуюся больше трех недель, для переливания не используют.

В связи с растущей потребностью в переливании крови появились методы, позволяющие сохранить жизнеспособность эритроцитов в течение более длительного времени. В присутствии глицерина и других веществ эритроциты могут храниться сколь угодно долго при температуре от –20 до –197° С. Для хранения при –197° С используют металлические контейнеры с жидким азотом, в которые погружают контейнеры с кровью. Кровь, бывшую в заморозке, успешно применяют для переливания. Заморозка позволяет не только создавать запасы обычной крови, но и собирать и хранить в специальных банках (хранилищах) крови редкие ее группы. Раньше кровь хранили в стеклянных контейнерах, но сейчас для этой цели используются в основном пластиковые емкости. Одно из главных преимуществ пластикового мешка состоит в том, что к одной емкости с антикоагулянтом можно прикрепить несколько мешочков, а затем с помощью дифференциального центрифугирования в «закрытой» системе выделить из крови все три типа клеток и плазму. Это очень важное новшество в корне изменило подход к переливанию крови. Сегодня уже говорят о компонентной терапии, когда под переливанием имеется в виду замена лишь тех элементов крови, в которых нуждается реципиент. Большинству людей, страдающих анемией, нужны только цельные эритроциты; больным лейкозом требуются в основном тромбоциты; больные гемофилией нуждаются лишь в определенных компонентах плазмы. Все эти фракции могут быть выделены из одной и той же донорской крови, после чего останутся только альбумин и гамма-глобулин (и тот, и другой имеют свои сферы применения). Цельная кровь применяется лишь для компенсации очень большой кровопотери, и сейчас ее используют для переливания менее чем в 25% случаев.

При острой сосудистой недостаточности, вызванной массивной кровопотерей или же шоком вследствие тяжелого ожога либо травмы с обморожением тканей, требуется очень быстро восстановить объем крови до нормального уровня. Если цельная кровь недоступна, для спасения жизни больного могут быть использованы ее заменители. В качестве таких заменителей чаще всего применяется сухая человеческая плазма. Ее растворяют в водной среде и вводят больному внутривенно. Недостаток плазмы как кровезаменителя состоит в том, что с ней может передаваться вирус инфекционного гепатита. Для снижения риска заражения используются различные подходы. Например, вероятность заражения гепатитом уменьшается, хотя и не сводится к нулю, при хранении плазмы в течение нескольких месяцев при комнатной температуре. Возможна также тепловая стерилизация плазмы, сохраняющая все полезные свойства альбумина. В настоящее время рекомендуется использовать только стерилизованную плазму. В свое время при тяжелом нарушении водного баланса, обусловленном массивной кровопотерей или шоком, в качестве временных заменителей белков плазмы применялись синтетические кровезаменители, например полисахариды (декстраны). Однако применение таких веществ не дало удовлетворительных результатов. Физиологические (солевые) растворы при срочных переливаниях тоже оказались не столь эффективны, как плазма, раствор глюкозы и другие коллоидные растворы.

Во всех развитых странах создана сеть станций переливания крови, которые обеспечивают гражданскую медицину необходимым количеством крови для переливания. На станциях, как правило, только собирают донорскую кровь, а хранят ее в банках (хранилищах) крови. Последние предоставляют по требованию больниц и клиник кровь нужной группы. Кроме того, они обычно располагают специальной службой, которая занимается получением из просроченной цельной крови как плазмы, так и отдельных фракций (например, гамма-глобулина).При многих банках имеются также квалифицированные специалисты, проводящие полное типирование крови и изучающие возможные реакции несовместимости.

Перед переливанием определяют совместимость крови донора и реципиента, для чего проводится типирование крови. В настоящее время типированием занимаются квалифицированные специалисты. Небольшое количество эритроцитов добавляют к антисыворотке, содержащей большое количество антител к определенным эритроцитарным антигенам. Антисыворотку получают из крови доноров, специально иммунизированных соответствующими антигенами крови. Агглютинацию эритроцитов наблюдают невооруженным глазом или под микроскопом. В качестве дополнительной проверки in vitro можно смешать эритроциты донора с сывороткой реципиента и, наоборот, сыворотку донора с эритроцитами реципиента – и посмотреть, не будет ли при этом агглютинации. Данный тест называют перекрестным типированием. Если при смешивании эритроцитов донора и сыворотки реципиента агглютинирует хотя бы небольшое количество клеток, кровь считается несовместимой.

Принятая международная классификация обозначает каждую группу крови по наличию или отсутствию в ней двух агглютининов сывороток, которые названы альфа (а) и бета (b) и двух агглютиногенов эритроцитов, названных А и В.

Первая группа крови определяется тем, что в ее эритроцитах отсутствуют агглютиногены, а в сыворотке имеются оба агглютинина – альфа и бета. Таким образом, полная формула крови 1 группы: I (0ab).

В крови II группы эритроциты имеют только один агглютиноген – А, а сыворотка содержит один агглютинин – бета. Таким образом, полная формула крови II группы: II(Ab).

III группа крови характеризуется тем, что эритроциты имеют только один агглютиноген – В, а ее сыворотка содержит только один агглютинин – альфа. Таким образом, полная формула крови III группы: III (Ва).

IV группа крови отличается тем, что ее эритроциты имеют оба агглютиногена – А и В, а ее сыворотка вообще не содержит агглютининов. Таким образом, полная формула крови IV группы: (АВо).

В настоящее время принято обозначать группы крови цифрой и по содержанию агглютиногенов эритроцитов: I(0); II(А); III(В); IV(AB).

В практической работе по переливанию крови пользуются делением людей на четыре группы. Распределение групп крови среди населения разных стран имеет некоторые различия, но в среднем считается, что людей I(0) группы – 41 %, II(А) – 38 %, III(B) – 18 % и IV(AB) – 3 %.

У 85 % людей эритроциты имеют особое антигенное вещество, названное резус-фактор. Эти люди считаются резус-положительными, а остальные 15 %, не имеющие в крови резус-фактора, резус-отрицательными. Переливание резус-положительной крови резус-отрицательным больным приводит к выработке у них резус-антитела. При повторных переливаниях у них наступает тяжелая посттрансфузионная реакция, способная привести к смертельному исходу. Для предупреждения этого осложнения обязательно исследование крови на содержание резус-фактора. Резус-отрицательным больным, а также во всех сомнительных случаях можно переливать только резус-отрицательную кровь.

Переливание крови производится в обязательном порядке после:

1. Определения группы крови больного.

2. Определения группы крови донора.

3. Пробы на индивидуальную совместимость.

4. Пробы на биологическую совместимость.

Противопоказаниями к переливанию крови следует считать:

1. Тяжелые нарушения функций печени и почек (острые гепатиты, острые пефрозонефриты воспалительной этиологии, амилоидоз и др.).

Однако, если заболевание этих органов связано с интоксикацией, то в ряде случаев переливание крови производимое небольшими дозами, капельно, может привести к улучшению их функций.

2. Декомпенсация сердечной деятельности с явлениями отеков, асцита и др.

3. Заболевание легких, сопровождающиеся выраженным застоем в малом круге кровообращения.

4. Аллергические состояния и заболевания (например, острая экзема, бронхиальная астма и др.).

5. Активный туберкулезный процесс в стадии инфильтрата.

1. **Необходимость создания искусственной крови**

Идея создания заменителей донорской крови возникла еще в конце 1950-х. Ведь искусственная кровь заведомо ничем не заражена, не нуждается в подборе по антигенным группам, менее чувствительна к условиям хранения. И что особенно важно – ее производство в любой момент может резко увеличено. Конечно, никто не надеялся создать субстанцию, способную выполнять все функции крови. Главное, что должен был уметь делать будущий кровезаменитель – это разносить по тканям тела кислород.

Двадцать второго августа 2002 года в калифорнийском городе Фресно произошла такая история. Как-то утром офицер Русс Корнелисон вышел из своего дома и столкнулся с подозрительным типом. Когда незнакомец бросился наутек и скрылся в своем доме, собака Корнелисона бросилась за ним в погоню. Офицер Корнелисон успел вовремя нагнуться, когда над ним просвистела пуля, второй выстрел поразил его верного четвероногого друга. Пули прошили собаке левую переднюю и правую заднюю лапы, правое легкое и левое ухо. Раненый пес выжил благодаря **оксиглобину** – заменителю крови, разрешенному для использования только в ветеринарии. В то же время это единственный кровезаменитель на американском рынке. Хотя препараты, подобные **оксиглобину**, часто называют «заменителями крови» или «искусственной кровью»,более точно называть это «кислородной терапией».В отличие от настоящей крови препараты для кислородной терапии не вызывают коагуляцию на поверхности раны и не вступают в борьбу с инфекцией. Самое главное, что эти препараты выполняют основную функцию крови – поставлять кислород к тканям. Ведь если снабжение кислородом прекращается хотя бы на несколько минут, это может привести к серьезным поражениям нервной системы.

Существует версия, что впервые переливания крови были выполнены еще инками, однако формирование трансфузиологии как науки произошло уже в 20 веке, когда были открыты группы крови, выяснена молекулярная, а затем генетическая основа различных ее компонентов. Переливание крови – это надежда на спасение человека и одновременно риск занести инфекцию. По данным европейских исследований, на миллион переливаний приходится семь случаев заражения гепатитом В,15 – гепатитом С, до двух – ВИЧ-инфекцией.

«Особый страх перед донорской кровью вызвала эпидемия СПИДА, - говорит врач-инфекционист, директор клиники «Витацелл» Игорь Марков. – В 1983 году медики обнаружили вирус иммунодефицита человека (ВИЧ).Но массовое тестирование началось только в 1985 году. За эти два года только во Франции медики заразили СПИДом около тысячи человек».Не менее драматична история с вирусами гепатитов. Сначала кровь тестировали только на гепатит В, однако люди продолжали заболевать после переливаний (до 17% пациентов).Как выяснилось, вызывал заболевание уже другой вирус гепатита - С.Вскоре ученые узнали о существовании гепатита D.Сегодня уже известно восемь разновидностей гепатита, но реципиенты продолжают заболевать желтухой после переливаний. При этом донорскую кровь не проверяют на такие инфекции, как вирус герпеса, цитомегаловирус, инфекционный мононуклеоз, токсоплазмоз, лейшманиоз, бруцеллез.

Есть и другие минусы переливания крови. Донорская кровь всегда вызывает стресс иммунной системы. Чем больше больной получил чужой крови, тем выше вероятность развития инфекций.«От одного донора нельзя взять 2-3 литра крови – объясняет профессор Виктор Мороз, директор Института общей реаниматологии РАМН. – Берется по 400 мл. Значит, если надо перелить человеку 3-6 л крови, то должно быть задействовано около десятка доноров. Совместимость при переливании крови донора с реципиентом, конечно, исследуется. А между донорами это не делается. Когда в организм попадает такое большое количество крови от разных доноров, бывает, находятся несовместимые доноры и возникают различные осложнения».

Отчасти поэтому в ряде цивилизованных стран развернулась кампания по пропаганде аутодонорства, то есть создания индивидуального запаса своей крови, чтобы в случае необходимости избежать переливания чужой. Такая кровь может храниться 10-15 лет. Однако некоторые считают, что нет смысла вводить это массово. Запас необходим лишь в некоторых случаях. Например, если человеку предстоит сложная операция или велик риск кровотечения во время родов. Аутодонорство – это тоже не панацея; оно доступно лишь весьма состоятельной части общества.

Необходимость создания искусственной крови обусловлена не только недостатками донорской крови, но и участившимися ситуациями, когда сразу требуется большое количество кровевосполнений (транспортные и промышленные аварии, вооруженные конфликты, стихийные бедствия и т.п.). Между тем делать большие запасы донорской крови, учитывая ограниченный срок ее годности, обременительно для бюджета здравоохранения. В условиях дорожных происшествий и стихийных катастроф возникает дефицит времени для доставки пострадавшего в стационар и определения группы его крови. На это отводится от 20 минут до одного часа. Потребность в переливании огромна: около одного переливания на 40-50 человек в год. Только в России донорская кровь нужна для 2-3 млн. переливаний в год, что составляет около 1 млн. литров. По данным фирмы ***Hema Gen*** (США), лишь в городах потребность мирового рынка в кровезаменителях, необходимых для хирургии, гемодилюции и травматологии, оценивается в 1,9-2,9 млрд. долларов. Армия США впервые осознала потребность в заменителях крови после Второй мировой войны. Во время войны возникали проблемы с поставками и хранением донорской крови. Поэтому в последующие десятилетия американская армия сыграла лидирующую роль в исследованиях по поиску кровезаменителей.

**4. Гемоглобиновые кровезаменители. Разработки и испытания**

В течение 60-х исследователи обратились к естественному эффективному поставщику кислорода – гемоглобину. Это белок красных кровяных клеток, который обеспечивает поступление кислорода из воздуха к тканям и углекислого газа – от тканей в воздух. Молекула гемоглобина состоит из двух молекул альфа-протеина и двух молекул бета-протеина. Если гемоглобин покидает защитную среду эритроцита, его молекула распадается на субъединицы, которые могут вызвать повреждения почек. Исследователи попробовали стабилизировать гемоглобин перекрестным связыванием альфа- и бета-субъединиц и соединением отдельных молекул гемоглобина с получением гемоглобинового полимера. Уже много раз казалось, что вот-вот будет создан газотранспортный гемоглобиновый кровезаменитель, но возникали новые проблемы, которые отбрасывали исследователей на исходные позиции. «Причин тому несколько, - объясняет Сергей Воробьев, старший научный сотрудник Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. – Сами по себе молекулы гемоглобина нельзя запустить в кровяное русло. Гемоглобин мгновенно будет связан белками плазмы, например, альбумином, превратится в гаптоглобин и будет утилизирован в почках, костном мозге и селезенке. Этот процесс может привести к гемоглобинурии (лихорадка, головные боли, боли в мышцах и суставах) и, хуже того, вызвать тромбоз сосудов».

Поскольку в крови гемоглобин находится внутри эритроцитов, естественно, появилась идея заключить его в «мешок» - микрокапсулу. Четверть века пытаются, смешивая фосфолипиды, холестерин, яичный лецитин, сделать оболочку капсулы. Опыты на животных показали, что такие искусственные клетки выживают в кровотоке лишь несколько часов. Иммунная система организма разрушает их и удаляет остатки из системы кровообращения, при этом возникает сильная аллергическая реакция. Кроме того, гемоглобин в искусственной оболочке работает неэффективно. Он присоединяет кислород в легких, но очень плохо отдает его в капиллярах кровотока.

Подобные трудности побудили разработчиков искусственной красной крови отказаться от микрокапсул и попытаться использовать свободный гемоглобин, но сшить его отдельные молекулы химическими методами, создав полигемоглобиновые кристаллы. Преимущество такого подхода в том, что полигемоглобиновые комплексы могут циркулировать в крови, не будучи распознаваемы иммунной системой. Хотя внутри эритроцита гемоглобин образует различные виды кристаллических упаковок, сами по себе эти упаковки очень хрупкие и вне эритроцита мгновенно разваливаются от небольших перепадов температуры или колебаний рН-среды. Чтобы сделать полигемоглобиновую упаковку устойчивой, ее сшивают глутаровым альдегидом или диимидоэфирами. Однако при этом, наряду с межмолекулярными, неизбежно возникают и внутримолекулярные сшивки, которые ограничивают подвижность частей молекулярной машины и существенно снижают ее газотранспортные способности. Кроме того, межмолекулярные сшивки могут изменять равновесные состояния между аминогруппами деталей белковой машины и ограничивать движение доменов внутри молекулы. Вот и приходится создателям гемоглобиновых кровезаменителей метаться меж двух огней: сильно сошьешь молекулы – ликвидируешь газотранспорт, слабо соединишь гемоглобины – они развалятся в кровотоке и приведут к тромбообразованию.

В 1990-х медицинская корпорация ***Baxter*** заняла лидерство в гонке за появление на рынке препаратов для кислородной терапии, сделанные на основе гемоглобина. К 1998 году на третью стадию клинических испытаний поступил **ГемАссист** – раствор, содержащий связанный гемоглобин. Компания Baxter создала этот продукт для помощи пациентам, которые потеряли много крови. Однако когда медики проанализировали данные по 100 пострадавшим от огнестрельных или колотых ранений и жертвам автомобильных аварий, выяснилось, что пациенты, которые применяли **ГемАссист**, умирали чаще, чем те, кто получал натуральную кровь. Этого оказалось достаточно для того, чтобы ***Вaxter*** приостановила испытания и прекратила выпуск препарата.

К середине 2003 года исследователи уже провели десятки испытаний на животных и клинические испытания препаратов для кислородной терапии на основе гемоглобина. Но до сих пор Управление по контролю за пищевыми продуктами и лекарствами США (FDA) не разрешило эти препараты для лечения людей. Почему это длится так долго? Доктор Абду Элайш из Центра биологических исследований FDA объясняет: «Доклинические и клинические испытания препаратов выявили общие для них побочные эффекты (имеется в виду повышение кровяного давления, нарушение работы желудочно-кишечного тракта, панкреатит и поражения нервной системы).Поскольку в начале производства доклинические и клинические испытания на здоровых добровольцах проводились успешно, мало внимания было уделено механизму работы молекулы гемоглобина в новых условиях (то есть вне красных клеток крови),не говоря о влиянии химических и генетических манипуляций с молекулой гемоглобина». **ГемАссист** не выдержал клинических тестов, что подтверждает точку зрения доктора Элайша о том, что вне клетки молекула гемоглобина может повести себя совершенно неожиданно. Тем не менее, американские компании продолжают исследования по поиску новых гемоглобиновых средств для кислородной терапии.

Три компании пошли по пути создания препаратов на основе гемоглобина из донорской крови, которая превысила срок хранения. Для изготовления **Гемоспана** (Hemospan) компания ***Sangart Inc.*** (Сан-Диего, Калифорния) обезвредила изолированный гемоглобин, обработав белки полиэтиленгликолем. Как утверждает компания, при добавлении полиэтиленгликоля образуется слой воды, который окружает белок. Этот водяной слой защищает белок о атаки иммунной системы, увеличивает эффективный размер молекулы гемоглобина и продлевает время его циркуляции. ***Sangart*** в конце 2003 года начала вторую стадию клинических испытаний в Швеции. Испытания искусственной крови, которая может вливаться пациенту независимо от его группы крови, проводились в двух больницах Стокгольма — Южной и Каролинской. В испытаниях **Hemospan** приняли участие 8 пациентов. По словам профессора медицины Бенгта Фаргелля, испытания нового американского заменителя крови **Hemospan** в Швеции дали хорошие результаты. Явными преимуществами препарата, заменяющего кровь, является его совместимость с любой группой крови, малый риск заражения и длительный срок хранения. Недостаток **Hemospan**, по словам Бенгта Фаргелля, в том, что проводимость кислорода этим заменителем крови сокращается практически в два раза за первые двое суток. Именно по этой причине искусственная кровь может применяться лишь в неотложной ситуации.

***Northfield Laboratories Inc***.(Эвангстон, Иллинойс) и компания ***Hemosol Inc.*** (Миссиссуага, Онтарио, Канада) полимеризовали человеческий гемоглобин для придания ему стабильности.

В июне 2003 года лаборатория ***Northfield*** объявила, что компания достигла соглашения с FDA на проведение третей стадии клинических испытаний пиридоксилированного полимеризированного гемоглобина под названием **ПолиГем**. Polyheme – гемоглобин-кислородный носитель, как единственный кровезаменитель, завершивший фазу третьего клинического испытания, представляет собой ведущую технологию в этой области. Разработанный и произведенный в Чикаго основавшее Polyheme первоначально готовился как военный проект после Вьетнамской войны и показал большой потенциал как для военного так и гражданского использования. Извлечение и фильтрация гемоглобина из красных кровяных телец - первый шаг в производстве. Затем, используя многоступенчатый процесс полимеризации, очищенный гемоглобин связывается в тетрамеры и, как конечный шаг, включается в раствор электролита. Полимеризация гемоглобина - критический шаг этого процесса, поскольку, как было продемонстрировано в неудачных попытках замен крови, когда гемоглобин разобщен, он стремится принять оксид азота, что вызывает сужение сосудов. Также, свободный гемоглобин может быть принят почками, вызывая различные нарушения работы органов. Недавно ***Northfield Laboratories*** изучала испытания третей стадии клинических испытаний, в которых они прошли свыше 20 циклов в центрах травматологии по всей стране. Дискуссия возникает из-за того, что участники этого анализа неспособны дать согласия из-за природы их повреждений. Хотя эта практика санкционирована Федеральным Управлением Лекарственных Препаратов И Продуктов Питания как необходимое непредвиденное исследование, общества защиты прав пациентов начали протестовать против анализа.

Компания ***Hemosol*** обработала гемоглобин о-раффинозой для производства **гемолинка** – полимерного гемоглобина. Хотя компания довела до конца последнюю стадию клинических испытаний, производство было остановлено в апреле 2003 года, поскольку принимавшие его пациенты испытывали побочные эффекты. Четыре месяца спустя компания объявила что препарат будет дополнительно исследован на животных. Пока препарат находится на второй стадии клинических испытаний.

Тем временем компания ***Baxter*** пыталась получить препараты, переносящие кислород,на основе гемоглобина, в том числе применила технологию с использованием рекомбинатной ДНК. В тот год, когда ***Baxter*** отказалась от своего кислородного препарата первого поколении, она приобрела компанию ***Somatogem Inc.***,которая работала над молекулой рекомбинатного гемоглобина. Тогда и ***Baxter*** сосредоточила силы на разработке рекомбинатного гемоглобина бактериального происхождения. Но 17 июля 2003 года компания объявила о своем решении не продолжать первую фазу клинических испытаний рекомбинантного гемоглобина, потому что кислородный препарат оказался неэффективным.

Технология с использованием рекомбинатной ДНК позволяла избегать зависимости от поставок донорской крови как источника гемоглобина. Корпорация ***Biopure***, нынешний лидер в торговле кислородными препаратами, для того чтобы не зависеть от поставок донорской крови, решила получать свою продукцию из бычьей крови. **Оксиглобин** – это полимезированный бычий гемоглобин, продукт, который ***Biopure*** продает как ветеринарный препарат. FDA и Европейская комиссия разрешили использовать это кислородное соединение для лечения анемии у собак. Ветеринарный продукт Biopure's Oxyglobin(R) [hemoglobin glutamer - 200 (бычий)], или HBOC-301, единственный кислородный терапевтический препарат, одобренный США. ***Biopure*** продала приблизительно 180,000 препаратов Oxyglobin. ***Biopure*** также выпустила **гемопьюр** – гемоглобин, молекулы которого претерпели поперечную сшивку. Заменитель состоит из гемоглобина, выделенного из крови животных и прошедшего очистку при помощи многократной фильтрации и хроматографии под высоким давлением. ***Biopure*** завершила третью стадию клинических испытаний и обратилась в FDA за разрешением продавать **гемопьюр** в США пациентам с острой анемией, перенесшим ортопедические операции. Новый заменитель прошел 20 циклов успешных клинических испытаний в Америке и Европе. Представители ***Biopure*** уверены в безопасности продукта. Южно-Африканская Республика стала первым в мире государством, одобрившим раствор, который может быть использован в качестве заменителя крови при переливании. Препарат **гемопьюр** является универсальным средством, которое можно вводить пациентам с любым типом крови. В отличие от донорской крови, которая в обязательном порядке должна быть заморожена и может храниться не более 42 суток, **гемопьюр** возможно хранить при комнатной температуре в течение двух лет. Южноафриканский Совет по медицинскому контролю одобрил решение об использовании Hemopure(R) [hemoglobin glutamer - 250 (бычий)], или HBOC-201 при лечении острой анемии, возникающей у пациентов, которым проведена хирургическая операция. Этот препарат создан на основе коровьего гемоглобина, причем в технологии его изготовления использованы все новейшие достижения микробиологии, позволяющие с уверенностью заявить, что в данном случае полностью исключен риск заражения человека заболеваниями крупного рогатого скота, в том числе коровьим бешенством. Исключен риск и заражения ВИЧ.

Ученые из нескольких европейских государств намерены в течение трех лет с помощью грибов и бактерий создать универсальный заменитель крови. Пока в проекте ***Euro Blood Substitutes*** участвуют 12 институтов, а координационный центр находится в Ноттингэмском университете. Цель нового проекта — сделать переливание более безопасным, поскольку использование донорской крови связано с высокими рисками, в частности, из-за повсеместного распространения СПИДа. Исследования начнут с двух микроорганизмов, которые биоинженеры уже применяют для производства лекарств — гриба Aspergillus niger и бактерии Escherichia coli. С их помощью планируется синтезировать белки, схожие с гемоглобином, которые будут способны переносить кислород между легкими и нуждающимися в нем органами. Основная сложность эксперимента заключается в том, что человеческий организм обычно «отторгает» чужие биомолекулы. «Новую кровь», в отличие от естественной, можно будет стерилизовать. Именно это, по мнению ученых, позволяет рассчитывать на популярность будущего препарата в Восточной Европе и в Африке, где отмечены частые случаи заражения СПИДом при переливании донорской крови. Кроме того, таким образом, ***Euro Blood Substitutes*** собирается привлечь новые инвестиции и общественное внимание к европейским биотехнологиям.

Использование не донорской, а иной крови помогло и одной европейской компании при производстве кислородных препаратов. ***«СангуБиоТех»*** (Виттен, Германия) получила свиной гемоглобин поперечной сшивкой с глутаральдегидом, в результате чего образовались гигантские полимерные структуры кровяного белка. В среднем эти гиперполимеры содержат по 10 связанных молекул гемоглобина. Продукт компании находится на стадии доклинических испытаний.

**5 Перфторуглероды – альтернатива гемоглобину. Их использование для создания кровезаменителей**

30 лет назад исследователи нашли альтернативу гемоглобину как переносчику кислорода – перфторуглероды (PFC). Молекулы перфторуглерода по своей структуре похожи на углеводороды, но атомы водорода в них замещены фтором. PFC и гемоглобин переносят кислород по разным механизмам. Во внеклеточном растворе гемоглобина кислород переносится так же, как и в эритроцитах. Кислород не связывается с PFC,но растворяется в нем и легко переходит в ткани с кислородным голоданием. PFC не растворяется в воде, как кровь, поэтому препараты на его основе переводят в эмульсию, прежде чем запустить их в кровоток. В 1989 году корпорация «Зеленый крест» (Осака, Япония) выпустила на американский рынок жидкий PFC под маркой **флюорозоль**. Недостатками **флюорозоля** был небольшой срок годности и температурная нестабильность. Он не пользовался большим спросом из-за узости разрешенной области применения – он годился только для коронарного шунтирования. В итоге «Зеленый крест» снял этот препарат с производства в 1994-м.

Несколько компаний разработали новое поколение перфторуглеродных переносчиков кислорода. Продукт ***Alliance Pharmaceutical Corporation*** (Сан-Диего, Калифорния) **оксигент** – это концентрированная эмульсия мельчайших частиц в водном растворе. Эти частицы в 30 раз мельче эритроцитов и состоят из перфторатного ядра, окруженного поверхностно-активным веществом. Вещество вводится сразу в кровеносную систему, где оно обогащается кислородом в легких, переносится в ткани с дефицитом кислорода и отдает им кислород путем обычной диффузии. В 2000 году ***Alliance*** и ***Baxter*** образовали компанию ***PFC Therapeutics LLC*** специально для наблюдения за разработкой, производством, продажей и распространением **оксигента** в США, Канаде и Европе. Компания завершила третью стадию клинических испытаний в Европе на послеоперационных пациентах.

***Synthetic Blood International Inc.***(Коста Меса, Калифорния) также разработала перфторуглеродный переносчик кислорода – **оксицит** (Oxycyte).

Как утверждается в описании препарата, **оксицит** - кислородо-несущая внутривенная эмульсия, которая может перенести в пять раз больше кислорода чем гемоглобин, делая это через эффективные средства перемещения кислорода к тканям и углекислого газа в легкие. Новое применение кислородных терапевтических препаратов включает в себя лечение паралича, инфаркта миокарда, и определенных злокачественных болезней. Компания планировала завершить первую стадию клинических испытаний к концу 2003 года. При испытаниях Oxycyte, прошедших прошлым летом, выжили 7 пациентов из 8, поступивших в центр VCURES. Причем они сравнительно быстро шли на поправку. Осенью 2006 года была выписана домой и неудачливая велосипедистка Бесс-Лин. Она много времени пролежала в коме, но, как считают в медицинском центре, не погибла именно благодаря переливанию экспериментального препарата (с согласия матери пациентки). Теперь же Бесс-Лин поднялась на ноги и выздоравливает, причем парализованная было сторона тела вновь обрела полную подвижность. Oxycyte внешне похож на молоко. Стало быть, про Бесс-Лин можно смело сказать: «У нее кровь с молоком!».

Растворы PFC, как и гемоглобиновые препараты, не лишены недостатков. Доктор Дэвид Г.Баррис – глава департамента хирургии в Университете здоровья в Бетесде, объясняет: «В перфторуглеродном растворе количество растворенного кислорода находится в линейной зависимости от того, сколько его вдохнули, в отличие от криволинейной зависимости в случае с гемоглобином». Поскольку FPC – менее эффективные, чем гемоглобин переносчики кислорода, то для того чтобы насытить ими ткани, требуется большая концентрация кислорода в воздухе, который, в свою очередь, может повредить легкие. Но доктор Баррис отмечает и преимущество FPC – они более приемлемы с точки зрения религии по сравнению с препаратами донорского или животного происхождения.

В настоящее время компании стремятся разработать кислородпереносящие препараты, которые бы усиливали доставку кислорода при нехватке крови или в том случае, когда кровь из-за болезни не может переносить достаточно кислорода. ***BioTime Inc.***(Беркли, Калифорния) работает над веществом, которое сможет по-настоящему на некоторое время заменить кровь. Некоторые хирургические операции проводят при низких температурах, чтобы замедлить у пациента обмен веществ и сократить потребность организма в кислороде. Ограничения метода низкотемпературной хирургии заключаются в том, что кровь не может циркулировать при температурах, близких к нулю. **ГетаКул** от ***BioTime***, производное искусственной плазмы, мог бы заменить пациенту кровь на этот период. ***BioTime*** провела опыты с **ГетаКул** на животных и готовит заявление на проведение клинических испытаний.

Проблема создания эмульсий на основе перфторорганических соединений для медико-биологических целей разрабатывается учеными уже несколько десятилетий. Актуальным является получение перфторуглеродных эмульсий, которые бы максимально соответствовали следующим требованиям:

• высокая газотранспортная способность;

• стабильность;

• низкая реактогенность;

• отсутствие токсичности.

**6. Получение эмульсий на основе перфторуглеродов. Перфторан**

В начале 80-х в подмосковном Пущино был создан заменитель крови – **перфторан**. Результаты пробного применения нового препарата в клиниках (а затем и прямо на поле боя в Афганистане) превзошли все ожидания.

В начале 60-х американец Генри Словитер предложил использовать эмульсию перфторуглеродов (ПФУ) – веществ, основу молекул которых образуют атомы угрерода, а все оставшиеся свободными валентности заняты атомами фтора. К этому классу соединений относится, например, всем известный тефлон. Было известно, что они легко поглощают большие объемы любых газов и также легко расстаются с поглощенным. Они химически инертны и физиологически нейтральны. В воде они практически нерастворимы, но при добавке поверхностно-активных веществ могут образовывать эмульсии – взвеси мелких жидких частиц. Каждая такая частица – это окруженная одним слоем молекул ПАВ капелька жидкого перфторуглерода. В ней-то и растворяется кислород.

Работы с эмульсиями ПФУ начались в США и Японии еще в 1969 году, однако после первых неудач вышли из моды. В конце 70-х Академии наук было поручено в кратчайшие сроки создать отечественный перфторуглеродный кровезаменитель. Головным учреждением был определен Пущинский Институт биофизики, который (как и весь научный центр) возглавлял профессор Генрих Иваницкий. «Дело в том, что мы с самого начала сделали эмульсию очень тонкой – средний диаметр частиц в ней на порядок меньше, чем у эритроцита, - рассказывает Генрих Иваницкий. – Это было вызвано технологическими соображениями: ПФУ намного тяжелее воды; эмульсия, предоставленная самой себе, постепенно оседает и расслаивается, но чем меньше частицы, тем медленнее это происходит. Неожиданно оказалось, что при тяжелых травмах размер частиц часто имеет решающее значение. Организм реагирует на травму усилением кровоснабжения пораженного места. Однако возникающий при этом отек сдавливает мелкие капилляры, делая их непроходимыми для эритроцитов. Кислородное снабжение поврежденной ткани ухудшается, в ней накапливается молочная кислота – и капилляры сжимаются еще сильнее. Особенно быстро и страшно эта ловушка срабатывает при отеках мозга – самой чувствительной к кислородному голоданию ткани. Но маленькие, скользкие, невосприимчивые к физиологическим регуляторам капельки ПФУ-эмульсии разрывают этот порочный круг, проникая в задыхающуюся ткань при любом состоянии капилляров и принося ей спасительный кислород».

Другой постоянной угрозой при тяжелых механических травмах является жировая эмболия: попадающие в кровяное русло (прежде всего из костного мозга раздробленных костей) частицы жира все время норовят слипнуться, и образующиеся жировые капли часто закупоривают сосуды. Но если в кровь примешан **перфторан**, частицы с оболочкой из ПАВ и перфторуглеродым содержимым поглощают жир из крови. Вдобавок **перфторан** снижает вязкость крови, облегчая тем самым работу сердца (что в некоторых случаях тоже важно), и обладает еще целым рядом полезных эффектов. Все это вкупе с ожидаемыми достоинствами (заведомым отсутствием инфекции, иммунологической нейтральностью и т.д.) делало его незаменимым препаратом для скорой помощи, военной медицины, медицины катастроф.

**Перфторан** – единственный в мире разрешенный к клиническому применению кровезаменитель с газотранспортной функцией на основе перфторуглеродных соединений. Препарат обладает газотранспортными, реологическими, гемодинамическими, диуретическими, мембраностабилизирующими, кардиопротекторными и сорбционными свойствами.

Перфторан рекомендуется применять в качестве кровезаменителя с газотранспортной функцией при:

• острой и хронической гиповолемии (травматическом, геморрагическом, ожоговом и инфекционно-токсическом шоке, черепно-мозговой травме, операционной и послеоперационной гиповолемии),

• нарушениях микроциркуляции и периферического кровообращения (изменении тканевого метаболизма и газообмена, гнойно-септическом состоянии, инфекции, нарушении мозгового кровообращении, жировой эмболии),

• регионарной перфузии, лаваже легких, промывании гнойных ран брюшной и других полостей,

• для противоишемической защиты донорских органов (предварительная подготовка донора и реципиента).

Противопоказанием к применению перфторана является гемофилия; в период беременности и кормления грудью препарат можно применять только по жизненным показаниям.

При использовании перфторана возможны аллергические реакции (крапивница, кожный зуд, покраснение кожных покровов), учащение пульса, снижение артериального давления, повышение температуры, головная боль, боли за грудиной и в поясничной области, затруднение дыхания, анафилактоидные реакции. Частота возникновения неблагоприятных реакций – 1,8 %.

Перфторан следует хранить в замороженном состоянии при температуре от -4 до -18°С. В размороженном виде препарат можно хранить в холодильнике при температуре +4°С не более 2-х недель. Срок годности препарата: 3 года – при температуре от -4 до -18°С ; 2 недели – при температуре +4°С.

Как видно из описания препарата процент возникновения неблагоприятных последствий после использования очень мал. Также он имеет достаточно большой срок годности. Но наиболее важно то, что препарат прошел все клинические испытания и разрешено его практическое применение в медицине.

**7. Перспективы и новейшие технологии**

Через несколько лет ученые смогут получить настоящий кровезаменитель, который в состоянии полностью заменить пациенту кровь при нормальной температуре.

В конце 2004 года исследователи из Парижского университета нашли способ производить в лабораторных условиях красные кровяные тельца. В ходе исследования ученые объединили стволовые клетки с еще одной группой кровяных клеток, а затем обработали их веществом, стимулирующим рост. Похожие эксперименты проводятся сейчас по всему миру - однако до сих пор успеха ученым добиться не удавалось. Отличие парижского исследования в том, что использованные клетки мышей впервые были помещены в условия, сходные с теми, в которых растут клетки костного мозга. В принципе, сходных результатов можно добиться, используя клетки того же человека, которому позже понадобится переливание крови, утверждает профессор Люк Дуэй, работавший в составе команды, поставившей этот эксперимент. "Это практически снимает иммунологические проблемы, связанные с отторжением тканей", - заявил он. В конечном итоге, рассчитывают ученые, их эксперимент приведет к тому, что начнется массовое производство искусственных красных кровяных телец. Однако пока рано говорить о том, что искусственную кровь можно будет использовать в клинических условиях.

Группа исследователей из трех крупных японских университетов разработала новую формулу искусственной крови, которая в ближайшее время сможет успешно устранить опасность заражения вирусами и будет абсолютно совместимой с любой группой крови при ее переливании. Это основные недостатки естественной крови, ограничивающие ее применение на борьбу с которыми потрачено немало денег времени и усилий.

Авторами сенсационной разработки синтетической крови стали специалисты из университетов Васэда, Кейо и Кумамото. Как сообщили специалисты одной из лабораторий, работавшей над проектом, новый тип искусственной крови можно производить в массовом масштабе и хранить относительно долгое время. Тем самым удается преодолеть еще один недостаток натуральной крови – небольшой срок хранения, необходимость специальных консервантов, в то же время ухудшающих ее свойства. Ученые в Японии уже провели весьма успешные опыты на животных и ожидают, что практическое применение их разработки начнется приблизительно, через два года, после, осуществления последней стадии клинических испытаний начатых на человеке.

К новинке проявили неподдельное внимание и интерес многие фармацевтические компании. Медикам из страны восходящего солнца удалось получить соединение, частицы которого по размеру меньше красных кровяных телец, а посему, они смогут снабжать кислородом человеческие органы, даже в тех случаях, когда в кровеносных сосудах возникают тромбы. В результате закупорки просвета сосудов эритроциты не всегда могут пройти в мелких капиллярах, даже учитывая хорошую эластичность и податливость сосудистых стенок, а также способность к деформации клеток крови. В таких случаях размеры частиц это как раз главное и их свойства окажутся эффективными как никогда и универсальная кровь может стать незаменимым лекарством для инсультов, инфарктов и других состояний, обусловленных нарушением кровотока в сосудах самого разного калибра, от средних, но суженных атеросклеротической бляшкой или тромбом, до капилляров.

Согласно сообщению Джерри Сквайрса, вице-президента Международного Красного Креста, как минимум три исследовательских лаборатории в Великобритании, США и Австралии практически закончили работы по созданию препаратов на основе гемоглобина, максимально приближенных к естественной крови. Эти препараты будут не только восполнять недостающий объем жидкости, как солевые растворы, и переносить кислород, как перфтораны, но и выполнять десятки других функций крови. Например, они могут связывать некоторые гормоны, регулируя их биологическую активность. Кроме того, благодаря своему родству с естественной кровью новые кровезаменители будут оставаться в организме намного дольше, чем современные препараты.

К сожалению, новые кровезаменители тоже не лишены ряда недостатков, причиной которых является именно их родство с натуральной кровью. Первичные испытания показали, что эти препараты могут спровоцировать повышение артериального давления или вызвать образование патологических тромбов.

«Перед нами встает дилемма, - заявил Джерри Сквайс. – Кровезаменители открывают перед врачами такие возможности, о которых пока можно только мечтать. Но, с другой стороны, до тех пор, пока мы не научимся их использовать, мы будем совершать опасные для жизни людей ошибки. И, к сожалению, это неизбежно».

**Заключение**

Важным разделом разработки новых кровезамещающих растворов для лечения кровопотери и шока является организация их доклинического и клинического изучения. При этом методика должна быть четко стандартизирована, исключительно большой значение имеет создание унифицированных моделей кровопотери, шока, которые могут быть реализованы для доклинической оценки новых кровезаменителей.

Эффективность нового кровезаменителя должна быть сопоставлена с эффективностью имеющихся аналогов. Окончательный итог работы по созданию нового кровезамещающего раствора, его качество и эффективность может быть объективно определены только на основе единой системы стандартизированных оценочных показателей доклинического изучения.

Частичным решением проблемы замены крови является введение в организм комплексных, полифункциональных препаратов, в составе которых наряду с кислородпереносящими кровезаменителями присутствуют и плазмозаменители (создание и применение последних играет немаловажную роль, так как существующие в настоящее время плазмозаменители могут восполнить 30-40% всех функций плазмы крови). И всегда нужно помнить о том, что переливание эмульсии отнюдь неравнозначно переливанию крови. Таким образом, создание универсальных кислородпереносящих кровезаменителей будет огромным шагом к решению проблемы "искусственной крови".