

КРОВЕЗАМЕНИТЕЛИ С ГАЗОТРАНСПОРТНОЙ ФУНКЦИЕЙ НА ОСНОВЕ ГЕМОГЛОБИНА

Селиванов Е.А.¹, Пшенкина Н.Н.², Мурзина Е.В.², Софронов Г.А.²,
Ханевич М.Д.¹, Сарычев В.А.³

¹ *Российский НИИ гематологии и трансфузиологии МЗСР РФ, 191024, Санкт-Петербург,
ул. 2-я Советская, д. 16. Тел/факс (812) 274-56-50.*

² *Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург,
ул. Академика Лебедева, д. 6. Тел. (812) 542-35-07, pshenkina@mail.ru*

³ *ООО «Геленпол», 249035, Калужская обл., г. Обнинск, пр. Маркса, д. 14.
Тел. (48439) 4-02-00.*

Резюме. Разработка кровезаменителей, обладающих с газотранспортными свойствами, является приоритетным направлением исследований в ведущих странах мира. Эти исследования ведутся в двух основных направлениях: на основе химически модифицированного внеэритроцитарного гемоглобина и на основе эмульсий перфторуглеродов. В обзоре рассмотрены основные проблемы, с которыми столкнулись исследователи и разработчики кровезаменителей на основе гемоглобина, пути их решения, а также охарактеризованы наиболее значимые и успешные разработки в этом направлении.

Ключевые слова: гемоглобин, кровезаменители-переносчики кислорода, доклинические исследования, клинические испытания, побочные эффекты.

OXYGEN CARRYING HEMOGLOBIN-BASED BLOOD SUBSTITUTES

Selivanov E.A.¹, Pshenkina N.N.², Murzina E.V.², Sofronov G.A.²,
Khanevich M.D.², Sarychev V.A.³

¹ *Russian Research Institute for Hematology and Transfusiology of Health Ministry of Russian Federation, 2 Sovetskaya, 16, Saint Petersburg, 191024*

² *Military Medical Academy named after S.M. Kirov, Academic Lebedev str., 6,
Saint Petersburg, 194044*

³ *Gelenpol, Ltd., Marx pr., 14, Obninsk, Kaluga region, 249035*

Abstract. Substantial efforts to develop a blood substitutes on the base of modified hemoglobin have been made since the end of last century. The review reflects main achievements and complications on the way of development of hemoglobin-based oxygen carriers.

Key words: hemoglobin, oxygen-carrying blood substitutes, preclinical and clinical trials, adverse effects.

В современной трансфузиологии наметилась отчетливая тенденция к минимизации использования донорской крови и ее компонентов. Это связано с рядом объективных причин. Во всем мире наблюдается сокращение числа доноров, что создает проблемы с обеспечением кровью и ее компонентами. В нашей стране только 1,4% населения сдают кровь, тогда как в Европе этот показатель составляет 4,02%, а в среднем в мире – 1,57% [17]. Число доноров в России за пятнадцать лет уменьшилось более чем вдвое. Так, в 1985 году количество доноров составляло 5,6 млн. человек, в 1995 году – 2,9 млн., а к 2006 году оно уменьшилось до 1,8 млн. По оценке Всемирной организации здравоохранения ежегодная мировая потребность в крови составляет 100 миллионов единиц. В США, где ежегодно используется приблизительно 12 миллионов единиц крови, по прогнозам к 2020 году нехватка составит около 3-4 млн. единиц [93]. В этот прогноз дефицита донорской крови не включена потребность в гемокомпонентах при стихийных бедствиях и в военных конфликтах.

Наряду с организационными проблемами донорства важное место занимает проблема биологической безопасности гемотрансфузий. Один из ее аспектов – это риск передачи гемотрансмиссивных инфекций (ВИЧ-инфекция, гепатиты В и С, сифилис и др.) при переливании крови и ее компонентов. Необходимость многочисленных тестирований вызывает неуклонный рост стоимости дозы донорской крови, но не в состоянии гарантировать полную безопасность реципиента [15]. В то же время большинство посттрансфузионных реакций и осложнений имеют иммунологическую природу, так как переливание аллогенной крови представляет собой, по существу, трансплантацию биологического антигенного материала от донора реципиенту. Одно из существенных ограничений к переливанию цельной крови связано с наличием в ней лейкоцитов – носителей антигенов гистосовместимости системы HLA. И хотя первые гемотрансфузии от HLA-несовместимого донора к осложнениям не приводят (так как у человека нет естественных антител к этим антигенам), в дальнейшем после частых повторных переливаний крови с образованием иммунных антиHLA-антител могут возникать пирогенные иммунные реакции негемолитического типа. Все вышеназванные проблемы являются объектом научных исследований и клинического анализа во всем мире [32, 59, 67, 101].

Другой проблемой является существенное изменение свойств крови и ее компонентов в процессе хранения. Даже при использовании самых современных гемоконсервантов уже в течение первых 10 суток хранения способность крови и эритроцитной массы к транспорту кислорода существенно уменьшается, а к 21 суткам

хранения происходит полная потеря эритроцитами 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) [91]. При этом установленный срок хранения эритроцитарной массы в России составляет 35 суток, а в США – 42 суток. Установлено, что число посттрансфузионных осложнений имеет прямую корреляцию со сроком хранения гемокомпонентов [59, 60, 67, 101].

В качестве альтернативы донорской крови рассматриваются искусственные кровезаменители, обладающие способностью транспортировать газы крови, прежде всего, кислород и углекислый газ [48, 63]. По сравнению с донорской кровью, кровезаменители имеют ряд преимуществ: они не требуют изосерологического подбора, свободны от инфекций, обладают длительным сроком годности, что позволяет запастись их в больших количествах и при необходимости использовать немедленно.

Разработки кровезаменителей с газотранспортными свойствами ведутся во всем мире со второй половины прошлого столетия в двух основных направлениях – на основе эмульсий перфторуглеродов и на основе гемоглобина (Hb) [23, 27, 29, 37, 47, 54, 63, 69, 82, 88]. В основе использования жидких перфторуглеродов в качестве газотранспортных сред лежит их способность растворять большие объемы газов (O_2 , CO_2 , NO, CO), которая сочетается с абсолютной химической инертностью этих соединений и, соответственно, с безопасностью для человека [2, 12]. Вопросы разработки и практического применения кровезаменителей на основе перфторуглеродов выходят за рамки настоящего обзора, для сведения можно адресовать читателя к соответствующим литературным источникам [1, 4, 10, 14, 23, 69].

Создание кровезаменителей на основе модифицированного Hb реализует идею моделирования естественного транспорта кислорода эритроцитами. Способность Hb сохранять свою структуру и функции вне эритроцитов была установлена в 30-х годах прошлого века [20]. Это открытие инициировало работы по созданию кровезаменителей переносчиков кислорода (КЗПК) на основе внеэритроцитарного Hb. Первые успешные попытки внутривенного введения растворов Hb были проведены W. Sellards, а в последствии лауреатом Нобелевской премии G. Minot в 1916 г. в Бостоне. Тогда 33 пациентам были введены небольшие объемы растворов свободного Hb и была отмечена их достаточно хорошая переносимость. Однако все последующие инфузии растворов Hb людям оказались менее успешными, так как вызывали серьезные побочные эффекты, в том числе, гипертензию, брадикардию, олигурию и даже анафилактикоидные реакции [78].

Дальнейшие исследования показали, что токсичность растворов свободного Hb обусловлена присутствием фрагментов стромы эритроцитов, низкой стабильностью тетрамеров Hb, которые в течение нескольких часов после инфузии диссоциируют до

низкомолекулярных димеров. К другим серьезным проблемам были отнесены увеличение сродства свободного Hb к кислороду вследствие потери 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ), низкая кислородная емкость растворов Hb, превращение гемоглобина в метгемоглобин, а также быстрая элиминация Hb из кровотока.

Исходя из этих представлений, усилия разработчиков при создании КЗПК на основе Hb «первого поколения» были направлены на разработку способов очистки растворов Hb от стромальных примесей, а также поиск способов регуляции сродства гемоглобина к кислороду и увеличения времени циркуляции молекул Hb в кровотоке [21, 39, 69]. Для увеличения времени циркуляции внеэритроцитарного гемоглобина в кровотоке были использованы различные способы его химической модификации, среди которых можно выделить следующие:

- внутримолекулярный кросс-линкинг – поперечные сшивки α или β цепей гемоглобина, например, диаспирином;
- «поверхностная декорация» – конъюгация молекулы гемоглобина с полимерами (декстраном, гидроксипропилкрахмалом, полиэтиленгликолем, инсулином, полиалкилен оксидом);
- полимеризация, в частности глутаровым альдегидом или о-раффинозой, приводящая к межмолекулярным сшивкам;
- сочетание внутримолекулярных и межмолекулярных сшивок;
- различные комбинации вышеперечисленных способов [69].

Разработки кровезаменителей на основе Hb за рубежом

Растворы модифицированного Hb «первого поколения»

В 80-90-х гг. прошлого столетия начато производство растворов модифицированного Hb в промышленных масштабах [69]. После получения от FDA (Food and Drug Administration, Управление по контролю качества пищевых продуктов и медикаментов, США) разрешения на проведение клинических испытаний растворов модифицированного Hb в США были начаты клинические испытания пяти кровезаменителей.

HemAssist (гемоглобин, внутримолекулярно сшитый диаспирином). Первоначально разработка препарата HemAssist проводилась в интересах вооруженных сил США, а в дальнейшем права на коммерческое производство и испытания были переданы фирме Baxter.

В 90-х годах были проведены клинические испытания препарата HemAssist при инфузии его больным хирургического профиля. Сообщалось о существенном снижении потребности в донорской крови и ее компонентах при использовании кровезаменителя [50, 79]. Вместе с тем, в качестве негативных эффектов были отмечены панкреатиты, нарушения функций печени и почек [79].

В ходе испытаний HemAssist при проведении неотложных мероприятий пострадавшим в несчастных случаях в США и в Европе было зарегистрировано увеличение смертности среди пациентов, получивших кровезаменитель [46, 86]. Учитывая выявленные неблагоприятные исходы, внедрение препарата HemAssist в клиническую практику было остановлено [50]. Согласно основной гипотезе, причиной увеличения летальности среди пациентов с тяжелыми травмами, получавших HemAssist, явилось вазоконстрикторное действие препарата, которое в условиях кровопотери значительно усугубляло тяжесть состояния пострадавших.

Optro™ (*Рекомбинантный Hb человека, rHb1.1*). В 1990 г. Hoffman et al. [39] были впервые опубликованы материалы о получении рекомбинантного гемоглобина человека, экспрессированного с использованием культуры *Escherichia coli*. В 1992 г. Looker et al. предложили использовать rHb1.1 в качестве искусственного переносчика кислорода [53]. В экспериментах на животных на модели геморрагического шока было отмечено положительное антигипоксическое и микроциркуляторное действие препарата [52, 53, 81]. Вместе с тем у животных были отмечены серьезные гемодинамические изменения, а также признаки нарушения функции поджелудочной железы [81].

Для снижения вазоконстрикторного эффекта rHb1.1 молекула Hb была модифицирована таким образом, чтобы исключить возможность связывания оксида азота (NO). Полученный препарат rHb2.0 прошел испытания на животных [56, 96]. Однако в ходе клинических испытаний были выявлены серьезные побочные эффекты, в результате на стадии II фазы испытания были прекращены.

Hemolink™ (*полимеризованный Hb человека, β -цепи которого поперечно сшиты о-раффинозой*). В результате сшивки образуются стабильные тетрамеры Hb М.м. 64 кДа. Кроме того, о-раффиноза взаимодействует с поверхностными аминокислотами тетрамеров, в результате чего образуются полимеры с М.м. 128-600 кДа. Окончательный продукт представляет собою смесь, содержащую около 40% стабилизированных тетрамеров и ~ 55% полимеров [28, 38, 64].

В экспериментах на животных на модели геморрагического шока Nemolink повышал уровень pO_2 , однако при этом был отмечен спазм сосудов и в ряде случаев развитие спонтанной гипертензии [24, 45, 64].

Оценка эффективности препарата Nemolink проводилась у больных, подвергавшихся аортокоронарному шунтированию [28, 36, 38]. На первом этапе II фазы клинических испытаний, проведенных на 60 больных, было показано, что после введения Nemolink уменьшается объем необходимой для трансфузии донорской эритромассы, но процент больных, нуждающихся в трансфузии, в обеих группах был примерно равным. В другом исследовании, проведенном также на 60 больных, после введения Nemolink отмечался более низкий процент пациентов, нуждающихся в гемотрансфузии (53% против 90% в контрольной группе). Вместе с тем, были отмечены побочные эффекты – гипертензия и желтуха. В III фазе испытаний было обследовано 299 больных. Здесь также было отмечено, что среди пациентов, получавших Nemolink, потребность в гемотрансфузиях была ниже, чем в контрольной группе (56% по сравнению с 76%). Из побочных эффектов опять же наблюдали гипертензию, желтуху, значительное повышение активности ферментов поджелудочной железы.

В результате Nemolink был снят с клинических испытаний, поскольку в ходе III фазы был выявлен высокий процент летальных исходов и инфарктов миокарда.

Hemopure (НВОС-201, бычий Hb, полимеризованный глутаровым альдегидом). НВОС-201 разработан фирмой Biopure [89]. Клинические испытания препарата Неморпуре проводились в США с целью коррекции периперационной кровопотери в ортопедии и сердечно-сосудистой хирургии. В результате I-III фаз клинических испытаний препарат Неморпуре был введен 797 больным [66]. Серьезные осложнения наблюдались у 23% больных, получавших Неморпуре, и у 18% пациентов контрольной группы.

Применение Неморпуре приводило к заметному снижению потребностей в трансфузиях аллогенных эритроцитов [49, 51]. Вместе с тем, при проведении клинических испытаний также был отмечен значительный вазоконстрикторный эффект после введения препарата [44]. Кроме того, у пациентов, получавших Неморпуре, отмечались абдоминальные боли, затруднения глотания, тошнота и рвота, олигурия и гипертензия; было отмечено повышение уровня амилазы и липазы, что может свидетельствовать о нарушениях микроциркуляции в поджелудочной железе.

В другом исследовании было отмечено, что у 58% больных после введения препарата обнаруживались антитела к НВОС-201. В то же время показатели,

характеризующие состояние свертывающей системы крови и функцию почек существенно не отличались от контроля [89].

Препарат Немориге был разрешен по жизненным показаниям в США и был зарегистрирован в ЮАР, где применялся в обычной клинической практике. В 2002 г. после рассмотрения результатов клинических испытаний препарата Немориге FDA предложило компании Биориге провести дополнительные исследования его эффективности и безопасности, однако в августе 2009 г. был получен окончательный отказ на проведение дальнейших испытаний препарата Немориге, в частности, в качестве КЗПК у пациентов на догоспитальном этапе. Фирма Биориге, понесшая значительные финансовые потери, заявила о банкротстве. В настоящее время фирма Биориге приобретена российской компанией ОПК Biotech, которая зарегистрировала Немориге в России и начинает продвижение препарата на российском рынке.

PolyHeme® (*полимеризованный Hb человека*). С 1994 г. фирма Northfield Laboratories вела разработку препарата PolyHeme на основе поперечно сшитых глутаровым альдегидом тетрамеров Hb. Hb, полученный из донорских эритроцитов с истекшим сроком хранения, подвергали полимеризации при обработке пиридоксальфосфатом и последующей очистке путем фильтрации [41, 90].

Клинические испытания препарата PolyHeme были проведены с участием пациентов с острым травматическим синдромом и нуждающихся в неотложном хирургическом лечении [33, 35]. В качестве контроля использовали ретроспективные данные о лечении 300 больных с подобной патологией, отказавшихся от трансфузии аллогенных эритроцитов по религиозным соображениям [25, 34]. В ходе первой стадии испытаний была отмечена хорошая переносимость препарата пациентами, отсутствие явных признаков гипертензии, а также снижение потребности в трансфузиях аллогенных эритроцитов у пациентов, получавших PolyHeme, по сравнению с больными контрольной группы. Из лабораторных показателей отмечено лишь достоверное повышение концентрации билирубина и амилазы.

В 2007 г. фирма Northfield Laboratories провела расширенные клинические испытания препарата PolyHeme. В эксперименте были задействованы 586 пациентов с посттравматическим геморрагическим шоком, из которых 279 пациентам вводили PolyHeme. Контрольную группу составили 307 человек, получавшие стандартную противошоковую терапию [58]. По истечении 30 сут. от начала курса интенсивной терапии летальность в опытной группе составила 11,1% (31 человек) по сравнению с 9,1% (28 человек) в контрольной группе. Потребность в переливании донорской

эритроцитарной массы составила 41% и 51%, соответственно. В числе наиболее частых осложнений в обеих группах регистрировались анемия, повышение температуры тела и нарушение баланса электролитов. Перечисленные осложнения были зарегистрированы у 93% пациентов опытной группы и у 88% пациентов контрольной группы. По общим итогам клинических испытаний препарата PolyHeme в 2009 г. FDA отказало фирме Northfield Laboratories в выдаче лицензии на использование данного кровозамещающего средства, что в условиях общих экономических трудностей привело к банкротству компании.

Таким образом, полный драматизма опыт разработки и клинических испытаний КЗПК на основе растворов модифицированного Hb «первого поколения» показал, что стромальные фрагменты эритроцитов и димеры Hb не являются главными факторами, определяющими развитие побочных эффектов при инфузии растворов Hb, и что дальнейшая очистка и стабилизация нативного Hb вряд ли снизят его токсичность. Стало очевидно, что необходимо дальнейшее изучение патофизиологических механизмов, вовлеченных в формирование комплекса побочных эффектов, возникающих при инфузиях кровезаменителей.

Новый импульс в разработке кровезаменителей на основе гемоглобина придало открытие биологической роли оксида азота, в частности его роли в регуляции тонуса сосудов и агрегации тромбоцитов, и, что особенно важно в контексте рассматриваемой проблемы, способности NO вступать во взаимодействие с гемом молекулы гемоглобина [55, 57, 61]. Связывание NO с молекулами внеэритроцитарного гемоглобина, привносимыми в кровоток при инфузиях кровезаменителей, неизбежно приводит к нарушению баланса вазопрессорных факторов. Учитывая мощную вазодилаторную активность NO, экстракция его из кровотока в результате взаимодействия с молекулами Hb приводит к развитию вазоконстрикции, которая практически всегда отмечалась при инфузиях кровезаменителей на основе внеэритроцитарного гемоглобина.

Свободный Hb, находясь вне своей естественной эритроцитарной среды, легко подвергаются аутоокислению, в результате которого гемовое железо переходит из двухвалентного состояния в трехвалентное. В процессе аутоокисления Hb происходит образование не только активных форм кислорода, но и активных форм азота. Близость свободного гемоглобина к эндотелиальным источникам NO, а также недостаточность естественной антиокислительной защиты создает предпосылки для запуска каскада реакций образования свободных радикалов, активации перекисного окисления липидов и включения других механизмов цитотоксичности и воспаления [19, 83, 84].

Другое объяснение вазоконстрикции, наблюдаемой при введении кровезаменителей на основе внеэритроцитарного гемоглобина, содержит так называемая ауторегуляторная теория, предложенная R. Winslow [97]. Суть концепции R. Winslow состоит в том, что при избыточной доставке кислорода к стенкам сосудов происходит запуск механизмов ауторегуляции, которые, вызывая сужение сосудов, ограничивают поступление кислорода в ткани.

Дальнейшие разработки гемоглобиновых кровезаменителей «второго поколения» проводились с учетом патофизиологических и биохимических механизмов токсичности свободного гемоглобина, а также теории гипероксической вазоконстрикции. Основные усилия были направлены на минимизацию взаимодействия гемоглобина с оксидом азота, предотвращение образования избыточных количеств свободных радикалов, а также на предотвращение гипероксии.

Гемоглобиновые кровезаменители «второго поколения»

Hemospan создан фирмой Sangart, Inc. (San Diego, CA, USA) и представляет собой продукт конъюгации гемоглобина человека с малеимид-активированным полиэтиленгликолем (MalPEG). Благодаря этому, в литературе Hemospan получил также название MalPEG-Hb или MP4 [94, 98]. Каждая молекула Hb конъюгирована в среднем с 7-8 молекулами MalPEG. Период полувыведения препарата после введения в дозе 100 мг/кг составляет 43 ч [22].

При разработке препарата были учтены представления о гипероксической вазоконстрикции. Преодоление избыточной доставки кислорода достигнуто за счет снижения концентрации гемоглобина до 4,2 г/дл и увеличения объема его молекулы вследствие выраженной гидратации PEG в водных растворах. Увеличение объема молекулы создает препятствие для диффузии Hb через стенки сосудов и ограничивает его кислород-транспортную функцию, что является одним из способов решения проблемы гипероксической вазоконстрикции. Кроме того, образующийся гидратированный поверхностный слой защищает молекулу Hb от агрегации и взаимодействия с белками плазмы, в том числе с компонентами системы комплемента, что также должно способствовать уменьшению побочных реакций.

Hemospan был подвергнут всесторонним доклиническим исследованиям с использованием животных разных видов на моделях гемодилюции и геморрагического шока [31, 92, 95, 99, 102, 103]. Проведенные исследования показали, что Hemospan не вызывал вазоконстрикции и угнетения сердечной деятельности.

Клинические испытания Hemospan были начаты в 2002 г. Более 150 добровольцев участвовало в четырех испытаниях препарата в рамках I и II фаз. В I фазе клинических испытаний, когда препарат вводили в дозах 100 мл и 200 мл, гемодинамических нарушений и реакций со стороны желудочно-кишечного тракта отмечено не было [22]. При введении кровезаменителя в дозах 200-1000 мл хирургическим больным ортопедического профиля в целом отмечена хорошая переносимость препарата, а также положительный гемодинамический эффект, однако отдельные эпизоды гипертензии все же были отмечены.

В ходе II фазы клинических испытаний в шести медицинских центрах Швеции Hemospan вводили в дозах 250 мл или 500 мл 90 больным, перенесшим операцию артропластики бедра [65]. Отмечено, что Hemospan хорошо переносился пациентами и не давал серьезных осложнений. Процент гипертензивных эпизодов в контрольной группе был зафиксирован у 87% больных, а в группах, получавших Hemospan в дозах 250 мл и 500 мл, он составил, соответственно, 46% и 42%. Вазоконстрикторный эффект также был заметно менее выраженным у испытуемых, получавших препарат, однако различия не были статистически значимыми. В мета-анализе побочных эффектов Hb-содержащих КЗПК, опубликованном С. Natanson et al. в 2008 г., отмечено, что в ходе II фазы клинических испытаний нежелательные клинические результаты применения Hemospan составили менее 2% [62].

В 2006 г. Sangart заявила о завершении II фазы клинических испытаний MP4, а недавно сообщила о проведении в Европе двух независимых всесторонних испытаний препарата в рамках III фазы. Целью данных исследований является оценка безопасности препарата при использовании в ортопедической хирургии, а также его эффективности в уменьшении гипотензии [94]. О результатах испытаний пока не сообщается.

Далее кратко охарактеризуем некоторые современные разработки, использующие различные способы химической модификации молекул гемоглобина.

OxyVita (*IBPL Pharm, Goshen, USA*), первоначально названный «Zero-link» (ZL-HbVv) [42, 43]. Препарат создан на основе бычьего Hb и представляет собой крупные стабильные комплексы поли-Hb фиксированного размера. Препарат обладает высоким'affинитетом к кислороду. Доклинические испытания показали хорошую переносимость препарата, эффективность при геморрагическом шоке, вызванном острой кровопотерей.

HemoTech создан в Научном Центре Здоровья Техасского Университета (США) и представляет собой высокоочищенный Hb быка, имеющий сложные сшивки. В частности, Hb подвергнут внутримолекулярной сшивке о-аденозином в комбинации с

восстановленным глутатионом (GSH), а также межмолекулярной сшивке с использованием о-АТФ. Предполагается, что в данном продукте о-аденозин нейтрализует вазоконстрикторное и провоспалительное действия гема. Конъюгация Hb с GSH делает молекулу Hb более электроотрицательной, что блокирует ее транспорт через почечные клубочки и эндотелий сосудов. В то же время GSH защищает гем от воздействия активных форм кислорода и азота, снижая прооксидантный и вазоконстрикторный потенциал Hb. В настоящее время в США решается вопрос о коммерческом производстве препарата HemoTech [85].

PolyHb-SOD-CAT разработан профессором Т.М. Chang в Канадском университете McGill [27, 30]. Препарат представляет собой бычий Hb, полимеризованный глутаровым альдегидом, и ковалентно связанный с каталазой и супероксиддисмутазой. Включение ферментов антиокислительной защиты способствует, с одной стороны, удалению из кровотока свободных радикалов и пероксидов, с другой – стабилизации полимеризованного Hb и уменьшению окисления гемового железа. В экспериментах на животных показано значительное снижение тяжести повреждений, вызванных ишемией-реперфузией, при использовании PolyHb-SOD-CAT [26, 68]. Препарат проходит клинические испытания и рассматривается в качестве перспективного терапевтического средства в клинических ситуациях, связанных с ишемией и развитием оксидативного стресса, таких как инсульт, инфаркт миокарда, геморрагический шок, трансплантация органов и др.

Еще одной разработкой коллектива исследователей, руководимого профессором Chang Т.М., является препарат **polyHb-Fg**, представляющий собой комплекс поли-Hb и фибриногена и обладающий тромбоцитоподобной активностью [100]. Предполагается, что препарат будет эффективен при массивной кровопотере, за счет не только обеспечения транспорта газов, но и поддержания гемостаза.

Клинические испытания проходит препарат **HemoZyme** (*SynZyme Technologies, Irvine, USA*), полинитроксилированный Hb человека, также обладающий антиоксидантной активностью [70]. Доклинические исследования проходит еще один препарат – невазоактивный свиной полимеризованный Hb, созданный в Северо-Западном Университете, *Xian, China* [104].

Другим направлением создания КЗПК, решающим проблемы естественной токсичности Hb, является инкапсулирование Hb в липосомы [73, 75]. Hb-везикулы (**HbV**), или инкапсулированный в липосомы Hb (**LEH**), являются искусственными переносчиками кислорода, созданными по подобию красных кровяных клеток. Инкапсулирование Hb

позволяет избежать ряда токсических эффектов, характерных для молекулярного Нб. Конъюгация с полиэтиленгликолем обеспечивает длительное хранение при комнатной температуре (около 2 лет), совместимость с кровью и увеличивает продолжительность периода полувыведения из сосудистого русла [76, 77, 87]. НbV не изменяют коллоидно-осмотического давления плазмы крови, которое регулируют дополнительным введением растворов других более крупных молекул, таких как сывороточный альбумин, гидроксиэтилкрахмал, декстран или желатин [40, 72, 71]. Эти свойства делают НbV весьма привлекательными в качестве искусственного кровезаменителя. Однако долгие годы разработок и исследований в Америке, Японии и в Европе до сих пор не имеют реализации в виде препаратов, пригодных для клинического использования. В настоящее время наиболее перспективными препаратами, рассматривающимися в качестве кандидатов для коммерческого производства, являются Нb-vesicles (НbV; Waseda Univ. & Keio Univ.); Neo Red Cells (TRM-645; Terumo Corp.); Artificial Red Cells (ARC; NOF Corp. & Waseda Univ.); Liposome-encapsulated Hb (LEH; US Naval Research Laboratory); Neohemocyte (NHC; Univ. of California, San Francisco); Synthetic Erythrocytes (SE; Rush–Presbyterian– St. Luke’s Medical Center, Univ. Illinois). Доклинические исследования проходят Нb-vesicles и Neo Red Cells, остальные препараты находятся в стадии разработки [74].

Отечественные разработки кровезаменителей на основе Нб

В 50-60-х гг. XX века в СССР в Ленинградском НИИ переливания крови начались работы по созданию кровезаменителей на основе очищенного от стромы гемоглобина человека. В результате в СССР был создан клинически доступный препарат **Эригем** (2,5-3,0 % гемоглобина и равное количество глюкозы в качестве стабилизатора), успешно использованный для кровезамещения во время операций на легких, а также при кровопотере в родах. Эригем имел очень высокое сродство к кислороду и низкую кислородную емкость (P_{50} составлял максимум 18 торр) при небольшом периоде полувыведения – 4-5 ч. Опыт клинического применения эригема показал, что кровезаменители на основе растворов нативного Нб нельзя расценивать в качестве полноценных переносчиков кислорода при несомненной эффективности их как препаратов гемостимулирующего и гемостатического действия, а также для восполнения дефицита объема циркулирующей плазмы при умеренной кровопотере [11].

В 1996 г. было начато клиническое изучение препарата **Геленпол**, созданного сотрудниками Российского НИИ гематологии и трансфузиологии МЗ РФ и Института высокомолекулярных соединений РАН на основе модифицированного Нб человека. В

1998 г. получено разрешение Минздрава России на медицинское применение и промышленное производство кровезаменителя Геленпол [13, 18].

Геленпол представляет собой лиофильно высушенный Нб, полимеризованный глутаровым альдегидом. Во флаконе находятся: сухой поликонденсированный Нб – 4,0 г; глюкоза (стабилизатор) – 3,0 г; натрия хлорид – 0,8 г; аскорбиновая кислота (стабилизатор) – 0,1 г [80]. Перед применением содержимое флакона растворяют в 400,0 мл стерильного 0,9% раствора хлорида натрия. Полученный раствор содержит 10,0 г/л Нб с молекулярной массой 150-260 кД. Раствор изоосмотичен плазме ($6,5 \leq \text{pH} \leq 7,5$) и предназначен для внутривенного введения *ex tempore*.

Доклинические исследования показали, что поликонденсированный Нб способен обратимо связывать кислород в легких и транспортировать его в ткани. Период полувыведения полимерного Нб из сосудистого русла равен 8-14 ч [80]. Геленпол не оказывает влияния на количество и специфическое действие Т- и В-лимфоцитов, фагоцитарную активность макрофагов, не снижает напряженность гуморального и клеточного иммунитетов. Препарат совместим с полиглюкином, изотоническим раствором хлорида натрия, мафусолом, гемодезом, полиоксидином, препаратами, применяемыми в кардиологической и анестезиологической практике [9, 13].

Клинические исследования, проведенные В.Е. Кориком (2000), свидетельствуют о комплексном воздействии геленпола на патологические процессы в условиях кровопотери [3, 5, 16]. Выраженность и стойкость гемодинамического эффекта от введения геленпола позволили авторам отказаться от назначения вазопрессоров и гормонов.

Геленпол использовался для коррекции гемодинамики, газотранспортной функции и кислотно-основного состояния (КОС) крови при острой кровопотере (в том числе и интраоперационной) и шоке, а также в качестве противоанемического средства при острых и хронических анемиях различной этиологии (В₁₂-железодефицитной, интоксикационной, раковой, постгеморрагической). Установлено, что наряду с газотранспортными и гемодинамическими свойствами, геленпол обладает стимулирующим влиянием на гемопоэз. При кровопотере и анемии геленпол вводился внутривенно со скоростью 60-90 капель в мин. Доза вводимого 1% раствора препарата составляла 25-30 мл/кг, т.е. от 400 до 2000 мл растворенного вещества. Кратность введения: 4-6 раз продолжительностью до 2-3 недель.

Геленпол был использован для коррекции интраоперационной кровопотери, до- и послеоперационной анемии более чем у 60 больных с острыми желудочно-кишечными кровотечениями, при вмешательствах по поводу рака желудка и толстой кишки. Инфузии

препарата осуществляли как в до-, так и в послеоперационном периоде, а также во время хирургического вмешательства. В ряде случаев инфузии геленпола проводились повторно до 4-6 раз. Мониторинг гемодинамических, гематологических и биохимических показателей, а также уровня КОС и pO_2 в крови показал, что геленпол хорошо переносился больными, не вызывал побочных эффектов, обеспечивал стабилизацию АД на уровне 80 – 115 мм рт.ст., нормализацию других гемодинамических показателей, улучшал работу сердца, уменьшал степень анемии, увеличивал степень насыщения Hb артериальной и венозной (с 32 до 44 мм рт.ст.) крови кислородом. Отмечалось улучшение микроциркуляции. Инфузия геленпола увеличивала содержание Hb в циркулирующей крови (в среднем с 68 до 88 г/л).

При геморрагическом и травматическом шоке инфузии геленпола оказывали выраженный гемодинамический эффект, уже через 10-15 минут от начала внутривенного вливания препарата наблюдалось улучшение гемодинамических показателей. Частота сердечных сокращений уменьшалась с $112 \pm 23,7$ до $98,3 \pm 10,3$ уд/мин и оставалась на уровне 95-100 уд/мин в течение часа после окончания инфузии. Увеличивалось как систолическое, так и диастолическое давление крови (АД). При этом стабилизация показателей АД отмечалась и после окончания инфузии препарата. Улучшались показатели ударного объема сердца и минутного объема кровообращения, центрального венозного давления.

Об улучшении газотранспортной функции крови свидетельствовали показатели напряжения кислорода в крови. Через 15 минут от начала введения геленпола напряжение кислорода в артериальной крови увеличивалось на 10 ед. и достигало 86 мм рт.ст. К 30 минуте, т.е. к завершению введения препарата, напряжение кислорода в артериальной крови оставалось на высоких показателях и имело тенденцию к увеличению. Дальнейшие исследования показали, что способность геленпола к активной газотранспортной функции в кровеносном русле оставалась на протяжении от 1 до 1,5 часов после переливания препарата. Дальнейшая оценка его газотранспортной функции не проводилась, так как на последних этапах оперативного вмешательства производилась трансфузия эритроцитарной массы или цельной крови. Другие показатели газотранспортной функции крови (P_{bO} ; P_aCO_2 ; P_vCO_2) также свидетельствовали об утилизации кислорода из микроциркуляторного русла тканями.

Таким образом, результаты клинического применения геленпола свидетельствуют о несомненной эффективности этого КЗПК при коррекции интраоперационной кровопотери и постгеморрагической анемии.

По экономическим мотивам в 90-е годы производство геленпола не было налажено, однако в последние годы в силу объективных причин интерес к препарату возродился. С введением в 2003 г. новых требований, аналогичным международному стандарту GMP (Good Medical Practice), возникла проблема перехода на качественно новый уровень «чистоты» продукта. Это потребовало внедрения современных наномолекулярных технологий разделения смеси веществ, молекулы которых различаются по массе, размерам и заряду, а также создания уникального оборудования для реализации «ноу-хау» в промышленном масштабе в связи с отсутствием образцов подобного оборудования на рынке.

В настоящее время технология производства кровезаменителя усовершенствована с учетом мировых научных достижений последних лет. Оригинальные технологические решения и основанный на них способ получения ГЕЛЕНПОЛА® относится к сфере нанотехнологий. Научные и технологические решения защищены шестью патентами и тремя авторскими свидетельствами [7, 6, 8]. В настоящее время в завершающей стадии находится строительство в Московской области предприятия по производству ГЕЛЕНПОЛА® с планируемой производительностью 1,5 млн. доз в год.

Заключение

За более чем 30-летнюю историю разработки кровезаменителей на основе внеэритроцитарного гемоглобина за рубежом создано свыше 20 прототипов на базе гемоглобина различного происхождения. Однако ни один из этих препаратов не внедрен в клиническую практику, а работы по многим из них вообще прекращены по причине серьезных побочных эффектов. Максимальный успех заключается в выходе отдельных препаратов на начальные стадии клинических испытаний. Попытки минимизации побочных эффектов сопровождаются появлением новых, все более сложных по молекулярному строению производных гемоглобина, синтез которых идет с привлечением широкого арсенала современных наукоемких технологий. Несмотря на достаточно медленное продвижение в заданном направлении, интенсивность работ, которые ведутся с привлечением огромных интеллектуальных и финансовых ресурсов, позволяет прогнозировать в недалеком будущем появление на рынке зарубежных кровезаменителей с газотранспортными свойствами.

В отличие от зарубежных аналогов российский кровезаменитель гемоглобинового типа «Геленпол» прошел все стадии клинических испытаний и получил разрешение на клиническое применение. Во время доклинических и клинических испытаний ГЕЛЕНПОЛА® на фоне высокой лечебной эффективности препарата не было выявлено

сколь-нибудь значимых побочных эффектов, что обусловлено использованием при создании препарата оригинальных решений, составляющих приоритет российских ученых. По своему составу и свойствам ГЕЛЕНПОЛ® можно поставить в ряд с новейшими мировыми разработками последних лет.

В связи с тем, что промышленное производство кровезаменителя «Геленпол» приобрело реальные перспективы, в ближайшее время можно ожидать появление на рынке отечественного кровезаменителя. В связи с этим, проблемы научно-методического сопровождения клинического внедрения Геленпола приобретают чрезвычайную актуальность и ставят целый ряд экспериментальных и клинических задач по уточнению показаний и областей его применения.

Литература

1. Воробьев С.И. Перфторуглеродные эмульсии I и II поколения // Хим.-фарм. журн. – 2009. – Т. 43. – № 4. С. 30-40.
2. Голубев А.М., Белоярцев Ф.Ф., Васильев А.Э., Покровский Ю.Э. Реакции биологических систем при замещении крови эмульсиями фторуглеродов. М.: ТЕИС, 1993.
3. Дьяконов А.Н., Бурданов А.П., Корик В.Е., Коновалов С.В. Применение геленпола при операциях на толстой кишке // Применение инфузионных антигипоксантов и искусственных переносчиков кислорода в хирургии: Сб. науч. тр. / СПб. 1999. С. 16-18.
4. Иваницкий Г.Р. Биофизика на пороге нового тысячелетия: перфторуглеродные среды и газотранспортные кровезаменители // Биофизика – 2001. – Т.46. – № 1. – С. 5-33.
5. Корик В.Е. Применение кровезаменителя-переносчика кислорода на основе модифицированного гемоглобина при лечении больных с тяжелой кровопотерей // Автореф. дисс... канд. мед. наук. – СПб., 2000.
6. Кузнецова Н.П., Гудкин Л.Р., Мишаева Р.Н. Способ получения полигемоглобина с повышенной кислородтранспортной эффективностью / Патент RU 2132687, 1999.
7. Кузнецова Н.П., Гудкин Л.Р., Селиванов Е.А. и др. Кровезаменитель-переносчик кислорода, состав для его получения и способ получения полимерного модифицированного гемоглобина / Патент RU2162707, 2001.
8. Самсонов Г.В. и др. Солевой раствор полимерного гемоглобина / Патент SU183354A3, 1992.
9. Селиванов Е.А., Быстрова И.М., Ханевич М.Д., Парашин М.Е. Экспериментальное и клиническое изучение кровезаменителя-переносчика кислорода на

основе модифицированного гемоглобина // Физиологически активные вещества на основе перфторуглеродов в военной медицине: Сб. матер. науч. конф. / СПб. 1997. – С. 95-96.

10. Селиванов Е.А., Софронов Г.А., Ханевич М.Д. и др. Эффективность применения перфторана в хирургической практике // Трансфузиология. – 2008. – № 2. – С. 78-88.

11. Селиванов Е.А., Софронов Г.А., Ханевич М.Д., Скрябин О.Н. Возможности применения модифицированного гемоглобина в хирургии // Трансфузиология. – 2008. – Т.9. – № 2. – С. 68-77.

12. Склифас А.Н., Шехтман Д.Г., Образцов В.В. и др. Механизмы распределения и выведения перфторуглеродов при многократных введениях // Биофизика. – 1998. – Т.43. – №1. – С. 171-176.

13. Софронов Г.А., Селиванов Е.А., Ханевич М.Д. Переносчики кислорода: состояние проблемы и перспективы развития // Применение инфузионных антигипоксантов и искусственных переносчиков кислорода в хирургии: Сб. науч. тр. / СПб. 1999. – С. 75-85.

14. Сухоруков В.П., Рагимов А.А., Пушкин С.Ю. и др. Перфторан – перфторуглеродный кровезаменитель с газотранспортной функцией // Пособие для врачей. – 2-е изд., перераб. и доп. / Москва.: Б.и., 2008.

15. Филатов Ф.П. Вирусная безопасность переливания крови // Природа. 2005. № 3. URL: http://vivovoco.rsl.ru/VV/JOURNAL/NATURE/03_05/VIRUS.HTM

16. Ханевич М.Д., Софронов Г.А., Селиванов Е.А., Корик В.Е. Применение искусственного переносчика кислорода на основе модифицированного гемоглобина у больных с гастродуоденальными кровотечениями // Вестн. хирургии им. И.И. Грекова. 2000. – Т. 159. – № 6. – С. 51-54.

17. Шевченко Ю.Л., Шабалин В.Н., Заривчацкий М.Ф., Селиванов Е.А. Руководство по общей и клинической трансфузиологии // СПб.: «Фолиант», 2003.

18. Ярочкин В.С., Кочемасов В.В. Гемодилюция. Настоящее и будущее // М.: Б.и., 1997.

19. Alayash A.I. Redox and Radical Reactions of Hemoglobin Solutions: Toxicities and Protective Strategies // In: Blood Substitutes. Ed. by R. Winslow / San Diego: Academic Press, 2006. – P. 197-205.

20. Amberson W.R. Blood substitutes // Biol. Rev. 1937. Vol. 12. P. 48-85.

21. Benesch R.E., Benesch R., Renthall R.D., Maeda N. Affinity labeling of the polyphosphate binding site of hemoglobin // Biochemistry. – 1972. – Vol. 11. – № 19. – P. 3576-3582.

22. Björkholm M., Fagrell B., Przybelski R. et al. A phase I single blind clinical trial of a new oxygen transport agent (MP4), human Hb modified with maleimide-activated polyethylene glycol // *Haematologica*. – 2005. – Vol. 90. – № 4. – P. 505-515.
23. Blood substitutes. Ed. by R. Winslow / San Diego: Academic Press. – 2006.
24. Carmichael F.J., Ali A.C., Campbell J.A. et al. A phase I study of oxidized raffinose cross-linked human hemoglobin // *Crit. Care Med*. – 2000. – Vol. 28. – № 7. – P. 2283-2292.
25. Carson J.L., Noveck H., Berlin J.A., Gould S.A. Mortality and morbidity in patients with very low postoperative Hb levels who decline blood transfusion // *Transfusion*. – 2002. – Vol. 42. – № 7. – P. 812-818.
26. Chang T.M. A nanobiotechnologic therapeutic that transport oxygen and remove oxygen radicals: for stroke, hemorrhagic shock and related conditions // In: *Artificial cells: biotechnology, nanomedicine, regenerative medicine, blood substitutes, bioencapsulation and cell/stem cell therapy*. Ed. by T.M. Chang / Singapore: World Science Publisher, 2007. P. 62-92.
27. Chang T.M. Nanobiotechnology for Hemoglobin-based blood substitutes // *Crit. Care Clin*. – 2009. – Vol. 25. – № 2. – P. 373-382.
28. Cheng D.C. Safety and efficacy of o-raffinose cross-linked human hemoglobin (Hemolink) in cardiac surgery // *Can. J. Anaesth*. – 2001. – Vol. 48. – № 4 (Suppl.) – S. 41-48.
29. Cohn C.S., Cushing M.M. Oxygen therapeutics: perfluorocarbons and blood substitute safety // *Crit. Care Clin*. – 2009. – Vol. 25. – № 2. – P. 399-414.
30. D'Agnillo F., Chang T.M. Polyhemoglobin-superoxide dismutase-catalase as a blood substitute with antioxidant properties // *Nat. Biotechnol*. – 1998. – Vol.16. – № 7. – P. 667-671.
31. Drobin D., Kjellstrom B.T., Malm E. et al. Hemodynamic response and oxygen transport in pigs resuscitated with maleimide-polyethylene glycol-modified hemoglobin (MP4) // *J. Appl. Physiol*. – 2004. – Vol. 96. – № 5. – P. 1843-1853.
32. Epstein J.S., Holmberg J.A. Progress in monitoring blood safety // *Transfusion*. – 2010. – Vol. 50. – № 7. – P. 1408-1412.
33. Gould S.A., Moore E.E., Hoyt D.B. et al. The first randomized trial of human polymerized hemoglobin as a blood substitute in acute trauma and emergent surgery // *J. Am. Coll. Surg*. – 1998. – Vol. 187. – № 2. – P. 113-120.
34. Gould S.A., Moore E.E., Hoyt D.B. et al. The life-sustaining capacity of human polymerized hemoglobin when red cells might be unavailable // *J. Am. Coll. Surg*. – 2002. – Vol. 195. – № 4. – P. 445-452.

35. Gould S.A., Moore E.E., Moore F.A. et al. Clinical utility of human polymerized hemoglobin as a blood substitute after acute trauma and urgent surgery // J. Trauma. – 1997. – Vol. 43. – № 2. – P. 325-331.
36. Greenburg A.G., Kim H.W. Use of an oxygen therapeutic as an adjunct to intraoperative autologous donation to reduce transfusion requirements in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery // J. Am. Coll. Surg. – 2004. – Vol. 198. – № 3. – P. 373-385.
37. Henkel-Honke T., Oleck M. Artificial oxygen carriers: a current review // AANA J. – 2007. – Vol. 75. – № 3. – P. 205-211.
38. Hill S.E., Gottschalk L.I., Grichnik K. Safety and preliminary efficacy of hemoglobin raffimer for patients undergoing coronary artery bypass surgery // J. Cardiothorac. Vasc. Anesth. – 2002. – Vol. 16. – № 6. – P. 695-702.
39. Hoffman S.J., Looker D.L., Roehrich J.M. et al. Expression of fully functional tetrameric human hemoglobin in Escherichia coli // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1990. – Vol. 87. – № 21. – P. 8521-8525.
40. Izumi Y., Sakai H., Kose T. et al. Evaluation of the capabilities of a hemoglobin vesicle as an artificial oxygen carrier in a rat exchange transfusion model // ASAIO J. – 1997. – Vol. 43. – № 4. – P. 289-297.
41. Jahr J.S., Varma N. PolyHeme. Northfield Laboratories // IDrugs. – 2004. – Vol. 7. – № 5. – P. 478-482.
42. Jahr J.S., Weeks, D.L., Desai, P. et al. Does OxyVita, a new-generation hemoglobin based oxygen carrier, or Oxyglobin acutely interfere with coagulation compared with normal saline or 6% hetastarch? // J. Cardiothorac. Vas. Anesth. – 2008. – Vol. 22. – № 1. – P. 34-38.
43. Jia Y., Alayash A.I. Effects of cross-linking and zero-link polymerization on oxygen transport and redox chemistry of bovine hemoglobin // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – Vol. 1794. – № 8. – P. 1234-1242.
44. Kasper S.M., Walter M., Grüne F. et al. Effects of a hemoglobin-based oxygen carrier (HBOC-201) on hemodynamics and oxygen transport in patients undergoing preoperative hemodilution for elective abdominal aortic surgery // Anesth. Analg. – 1996. – Vol. 83. – № 5. – P. 921-927.
45. Kerger H., Tsai A.G., Saltzman D.J. et al. Fluid resuscitation with O₂ vs. non-O₂ carriers after 2 h of hemorrhagic shock in conscious hamsters // Am. J. Physiol. – 1997. – Vol. 272. – № 1 (Pt. 2) – H525-537.

46. Kerner T., Ahlers O., Veit S. et al. DCL-Hb for trauma patients with severe hemorrhagic shock: the European "On-Scene" multicenter study // *Intensive Care Med.* – 2003. – Vol. 29. – № 3. – P. 378-385.
47. Kim H.W., Greenburg A.G. Artificial oxygen carriers as red blood cell substitutes: a selected review and current status // *Artif. Organs.* – 2004. – Vol. 28. – № 9. – P. 813-828.
48. [Kim H.W.](#), [Greenburg A.G.](#) Toward 21st century blood component replacement therapeutics: artificial oxygen carriers, platelet substitutes, recombinant clotting factors, and others // [Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.](#) – 2006. – Vol. 34. – № 6. – P. 537-550.
49. LaMuraglia G.M., O'Hara P.J., Baker W.H. et al. The reduction of the allogenic transfusion requirement in aortic surgery with a hemoglobin-based solution // *J. Vasc. Surg.* – 2000. – Vol. 31. – № 2. – P. 299-308.
50. Lamy M.L., Daily E.K., Brichant J.F. et al. Randomized trial of diaspirin cross-linked hemoglobin solution as an alternative to blood transfusion after cardiac surgery // *Anesthesiology.* – 2000. – Vol. 92. – № 3. – P. 646-656.
51. Levy J.H., Goodnough L.T., Greilich P.E. et al. Polymerized bovine hemoglobin solution as a replacement for allogeneic red blood cell transfusion after cardiac surgery: results of a randomized, double-blind trial // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2002. – Vol. 124. – № 1. – P. 35-42.
52. Loeb A.L., McIntosh L.J., Raj N.R., Longnecker D.E. Resuscitation after hemorrhage using recombinant human hemoglobin (rHb1.1) in rats: effects on nitric oxide and prostanoid systems // *Crit. Care Med.* – 1998. – Vol. 26. – № 6. – P. 1071-1080.
53. Looker D., Abbott-Brown D., Cozart P. et al. A human recombinant haemoglobin designed for use as a blood substitute // *Nature.* – 1992. – Vol. 356. – № 6366. – P. 258-260.
54. Lowe K.C. Genomics and blood substitutes for 21st century Europe ("EuroBloodSubstitutes") // *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 34. – № 6. – P. 589-599.
55. Lowenstein C.J., Dinerman J.L., Snyder S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger // *Ann. Intern. Med.* – 1994. – Vol. 120. – № 3. – P. 227-237.
56. Malhotra A.K., Kelly M.E., Miller P.R. et al. Resuscitation with a novel hemoglobin-based oxygen carrier in a Swine model of uncontrolled perioperative hemorrhage // *J. Trauma.* – 2003. – Vol. 54. – № 5. – P. 915-924.
57. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology // *Pharmacol. Rev.* – 1991. – Vol. 43. – № 2. – P. 109-142.

58. Moore E.E., Moore F.A., Fabian T.C. et al. Human polymerized hemoglobin for the treatment of hemorrhagic shock when blood is unavailable: the USA multicenter trial // J. Am. Coll. Surg. – 2009. – Vol. 208. – № 1. – P. 1-13.
59. [Moskowitz D.M.](#), [McCullough J.N.](#), [Shander A.](#) et al. The impact of blood conservation on outcomes in cardiac surgery: is it safe and effective? // [Ann. Thorac. Surg.](#) – 2010. – Vol. 90. – № 2. – P. 451-458.
60. Murphy G.J., Reeves B.C., Rogers C.A. et al. Increased mortality, postoperative morbidity, and cost after red blood cell transfusion in patients having cardiac surgery // Circulation. – 2007. – Vol. 116. – № 22. – P. 2544–2552.
61. Nakaki T. Physiological and clinical significance of nitric oxide // Keio J. Med. – 1994. – Vol. 43. – № 1. – P. 15-26.
62. Natanson C., Kern S.J., Lurie P. et al. Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis // JAMA. – 2008. – Vol. 299. – № 19. – P. 2304-2312.
63. Ness P.M., Cushing M.M. Oxygen therapeutics. Pursuit of an alternative to the donor red blood cell // Arch. Pathol. Lab. Med. – 2007. – Vol. 131. – № 5. – P. 734-741.
64. Ning J., Wong L.T., Christoff B. et al. Haemodynamic response following a 10% topload infusion of Hemolink™ in conscious, anaesthetized and treated spontaneously hypertensive rats // Transfus. Med. – 2000. – Vol. 10. – № 1. – P. 13-22.
65. Olofsson C., Ahl T., Johansson T. et al. A multicenter clinical study of the safety and activity of maleimide-polyethylene glycol Hemoglobin (Hemospan) in patients undergoing major orthopedic surgery // Anesthesiology. – 2006. – Vol. 105. – № 6. – P. 1153-1163.
66. Pearce L.B., Gawryl M.S., Rentko V.T. et al. HBOC-201 (Hemoglobin Glutamer-250 (Bovine), Hemopure®): Clinical studies // In: Blood substitutes. Ed. by R. Winslow / San Diego: Academic press, 2006. – P. 437-450.
67. Pirie E., Green J. A framework to support safe blood transfusion practice // Nurs. Stand. – 2010. – Vol. 24. – № 48. – P. 35-40.
68. Powanda D.D., Chang T.M. Cross-linked polyhemoglobin-superdioxide dismutase-catalase supplies oxygen without causing blood-brain barrier disruption or brain edema in a rat model of transient global brain ischemia-reperfusion // Art. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. – 2002. – Vol. 30. – № 1. – P. 25-42.
69. Riess J.G. Oxygen carriers (“blood substitutes”) – raison d’etre, chemistry and some physiology // Chem. Rev. – 2001. – Vol. 101. – № 9. – P. 2797-2920.

70. Saezler R.K., Arfors K.E., Tuma R.F. et al. Polynitroxylated hemoglobin-based oxygen carrier: inhibition of free radical induced microcirculatory dysfunction // *Free Radic. Biol. Med.* – 1999. – Vol. 27. – № 1-2. – P. 1-6.
71. Sakai H., Horinouchi H., Yamamoto M. et al. Acute 40 percent exchange-transfusion with hemoglobin-vesicles (HbV) suspended in recombinant human serum albumin solution: Degradation of HbV and erythropoiesis in a rat spleen for 2 weeks // *Transfusion.* – 2006. – Vol. 46. – № 3. – P. 339-347.
72. Sakai H., Masada Y., Horinouchi H. et al. Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats // *Crit. Care Med.* – 2004. – Vol. 32. – № 2. – P. 539-545.
73. Sakai H., Sou K., Horinouchi H. et al. Hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers: present situation and future visions // *J. Intern. Med.* – 2008. – Vol. 263. – № 1. – P. 4-15.
74. Sakai H., Sou K., Horinouchi H. et al. Review of hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers // *Artif. Organs.* – 2009. – Vol. 33. – № 2. – P. 139-145.
75. Sakai H., Sou K., Tsuchida E. Hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier // *Methods Enzymol.* – 2009. – Vol. 465. – P. 363-384.
76. Sakai H., Takeoka S., Park S.I. et al. Surface modification of hemoglobin vesicles with poly(ethylene glycol) and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats // *Bioconjug. Chem.* – 1997. – Vol. 8. – № 1. – P. 23-30.
77. Sakai H., Tomiyama K., Sou K. et al. Poly(ethylene glycol)-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state // *Bioconjug. Chem.* – 2000. – Vol. 11. – № 3. – P. 425-432.
78. Savitsky J.P., Doczi J., Black J., Arnold J.D. Clinical safety trial of stroma-free hemoglobin // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 1978. – Vol. 23. – № 1. – P. 73-80.
79. Schubert A., Przybelski R.J., Eidt J.F. et al. Diaspirin-crosslinked hemoglobin reduces blood transfusion in noncardiac surgery: a multicenter, randomized, controlled, double-blinded trial // *Anesth. Analg.* – 2003. – Vol. 97. – № 2. – P. 323-332.
80. Selivanov E.A., Kochetygov N.L., Bistrova I.M. et al. Study of polymerized hemoglobin in experiment // *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* – 1994. – Vol. 22. – № 5. – P. 156.
81. Siegel J.H., Fabian M., Smith J.A., Costantino D. Use of recombinant hemoglobin solution in reversing lethal hemorrhagic hypovolemic oxygen debt shock // *J. Trauma.* – 1997. – Vol. 42. – № 2. – P. 199-212.

82. Simoni J. Artificial oxygen carriers: scientific and biotechnological points of view // *Artif. Organs.* – 2009. – Vol. 33. – № 2. – P. 92-96.
83. Simoni J. Endothelial cell response to hemoglobin based oxygen carriers. Is the attenuation of pathological reactions possible? // In: *Artificial Oxygen Carrier. Its Front Line.* Kobayashi K, Tsuchida E, Horinouchi H, eds. / Tokyo: Springer-Verlag, 2005. – P. 25-75.
84. Simoni J., Simoni G., Moeller J.F. Intrinsic toxicity of hemoglobin: how to counteract it // *Artif. Organs.* – 2009. – Vol. 33. – № 2. – P. 100-109.
85. Simoni J., Villanueva-Meyer J., Simoni G. et al. Control of oxidative reactions of hemoglobin in the design of blood substitutes: role of the ascorbate-glutathione antioxidant system // *Artif. Organs.* – 2009. – Vol. 33. – № 2. – P. 115-126.
86. Sloan E.P., Koenigsberg M., Gens D. et al. Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock: a randomized controlled efficacy trial // *JAMA.* – 1999. – Vol. 282. – № 19. – P. 1857-1864.
87. Sou K., Klipper R., Goins B., et al. Circulation kinetics and organ distribution of Hb vesicles developed as a red blood cell substitute // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2005. – Vol. 312. – P. 702-709.
88. Spahn D.R., Kocian R. Artificial O₂ carriers: status in 2005 // *Curr. Pharm. Des.* – 2005. – Vol. 11. – № 31. – P. 4099-4114.
89. Sprung J., Kindscher J.D., Wahr J.A. et al. The use of bovine hemoglobin glutamer-250 (Hemopure) in surgical patients: Results of a multicenter, randomized single-blind study // *Anesth. Analg.* – 2002. – Vol. 94. – № 4. – P. 799-808.
90. Stowell C.P., Levin J., Spiess B.D., Winslow R.M. Progress in the development of RBC substitutes // *Transfusion.* – 2001. – Vol. 41. – № 2 – P. 287-299.
91. Strauss R.G. Blood banking issues pertaining to neonatal red blood cell transfusions // *Transfus. Sci.* – 1999. – Vol. 21. – № 1. – P. 7-19.
92. Tsai A.G., Vandegriff K.D., Intaglietta M., Winslow R.M. Targeted O₂ delivery by low-P₅₀ hemoglobin: a new basis for O₂ therapeutics // *Am. J. Physiol.* – 2003. – Vol. 285. – № 4. – P. 1411-1419.
93. Vamvakas E.C., Taswell H.F. Epidemiology of blood transfusion // *Transfusion.* – 1994. – Vol. 34. – № 6. – P. 464-470.
94. Vandegriff K., Winslow R.M. Hemospan: design principles for a new class of oxygen therapeutic // *Artif. Organs.* – 2009. – Vol. 33. – № 2. – P. 133-138.
95. Vandegriff K.D., Malavalli A., Wooldridge J. et al. MP4, a new nonvasoactive PEG-Hb conjugate // *Transfusion.* – 2003. – Vol. 43. – № 4. – P. 509-516.

96. von Dobschuetz E., Hutter J., Hoffmann T., Messmer K. Recombinant human hemoglobin with reduced nitric oxide-scavenging capacity restores effectively pancreatic microcirculatory disorders in hemorrhagic shock // *Anesthesiology*. – 2004. – Vol. 100. – № 6. – P. 1484-1490.
97. Winslow R. Current status of blood substitute research: towards a new paradigm // *J. Intern. Med.* – 2003. – Vol. 253. – №5. – P. 508–517.
98. Winslow R.M., Chapman K.W., Vandegriff K.D., Young M. Hemospan® (MP4), A human hemoglobin modified with maleimide-polyethylene glycol // In: *Blood Substitutes*. Ed. by R. Winslow / San Diego: Academic Press, 2006. – P. 470-482.
99. Winslow R.M., Lohman J., Malavalli A., Vandegriff K.D. Comparison of PEG-modified albumin and hemoglobin in extreme hemodilution in the rat // *J. Appl. Physiol.* – 2004. – Vol. 97. – № 4. – P. 1527–1534.
100. Wong N., Chang T.M. Polyhemoglobin-fibrinogen: a novel oxygen carrier with platelet-like properties in a hemodiluted setting// *Art. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 35. – № 5. – P. 481-489.
101. Yazer M.H., Triulzi D.J. Receipt of older RBCs does not predispose D-negative recipients to anti-D alloimmunization // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2010. – Vol. 134. – № 3. – P. 443-447.
102. Young M.A., Lohman J., Malavalli A. et al. Hemospan improves outcome in a model of peri-operative hemodilution and blood loss in the rat: comparison with hydroxyethyl starch // *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* – 2009. – Vol. 23. – № 3. – P. 339-347.
103. Young M.A., Riddez L., Kjellström B.T. et al. MalPEG-hemoglobin (MP4) improves hemodynamics, acid-base status, and survival after uncontrolled hemorrhage in anesthetized swine // *Crit. Care Med.* – 2005. – Vol. 33. – № 8. – P. 1794-1804.
104. Zhu X., Chu W., Wang F. et al. Variations in dominant antigen determinants of glutaraldehyde polymerized human, bovine and porcine hemoglobin // *Art. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 35. – № 5. – P. 518-532.