

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ:

НОВАЯ ИСКУССТВЕННАЯ КРОВЬ: СЕНСАЦИЯ БЕЗ СЕНСАЦИИ
(Комментарий к статье в журнале New Scientist от 13 марта 2004 года)

© 2004 г. Г.Р. Иваницкий, Е.И. Маевский

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290,
Пушино Московской области*

Поступила 19.03.04г.

В статье Сильвии Вестфал «Перспективы новой искусственной крови» приведено на первый взгляд сенсационное утверждение, что многочисленные разработчики искусственных кровезаменителей многие годы шли по неправильному пути и не понимали механизмы действия газотранспортных кровезаменителей, а сейчас это понимание появилось. В комментируемой статье приводятся три положения, которым должны отвечать газотранспортные кровезаменители. Утверждение, что разработчики газотранспортных кровезаменителей не знали о них раньше, с нашей точки зрения, является сомнительным. Нам они были известны и учтены при разработке российского газотранспортного кровезаменителя *перфторан*.

Ключевые слова: искусственная кровь, перфторуглероды, оксид азота, перфторан.

Появившаяся в интернете на сайте английского научно-популярного журнала «New Scientist» (www.newscientist.com/news.jsp?id=ns99994760) статья Сильвии Вестфал «Перспективы новой искусственной крови» (*Sylvia P. Westphal "New artificial blood shows promise"*) вызвала в российских средствах массовой информации повышенный интерес. Многие газеты перепечатали ее содержание. В статье приведено на первый взгляд сенсационное утверждение, что много-численные разработчики искусственных кровезаменителей многие годы шли по неправильному пути и не понимали механизмы действия газотранспортных кровезаменителей. Только как бы сейчас это понимание появилось. Со ссылкой на двух известных американских ученых из Калифорнийского университета Маркоса Интаглиетта (M. Intaglietta) и Роберта Уинслоу (R. Winslow) в комментируемой статье приводятся три положения:

1. Главное в борьбе с гипоксиями тканей не повышение кислородной емкости кровезаменителя, а преодоление спазма капилляров.

2. Свободно циркулирующий в крови гемоглобин заполняет пространство между эритроцитами и связывает оксид азота (NO), тем самым препятствует раскрытию капилляров.

3. Пониженная вязкость кровезаменителей не способствует открытию капилляров.

Далее в этой статье сообщается, что учет приведенных выше положений позволил компании Уинслоу сделать новый искусственной заменитель крови на основе гемоглобина, названный им MP4, который в Швеции успешно прошел испытание на 20 добровольцах.

Поскольку наш институт имеет отношение к созданию газотранспортных кровезаменителей, то естественно, что представители российских средств массовой

информации стали обращаться к нам с просьбами прокомментировать это сообщение, что и послужило причиной написания этого письма - комментария.

Забегая вперед, отметим, что все указанные выше положения абсолютно правильные. Сомнительным является только утверждение, что разработчики газотранспортных кровезаменителей не знали о них раньше. По крайней мере, нам они были известны и учтены при разработке российского газотранспортного кровезаменителя *перфторан*.

Почему создание газотранспортных кровезаменителей вызывает повышенный интерес средств массовой информации? Ответ - очевиден. Надежные синтетические кровезаменители, не требующие определения групповой совместимости, необходимы для всех людей. Они нужны и не только, и не столько в связи с плановыми хирургическими операциями, а необходимы прежде всего в экстремальных ситуациях, когда имеет место дефицит времени для оказания первой помощи пострадавшим и сразу требуется большое количество кровевосполнений (транспортные и промышленные аварии, вооруженные конфликты, терроризм, стихийные бедствия и т.л.). Кроме того, пандемия гепатитов и особенно ВИЧ-инфекций породили страх перед донорской кровью и ее компонентами. Как показывает мировая статистика, при тщательном контроле крови (и препаратов, получаемых из нее) вероятность заразиться СПИДом, хотя и небольшая, но существует всегда. Традиционные кровезаменители (кристаллоидные растворы, плазмозекспандеры, реолого-метаболические препараты, плазма крови и др.) обеспечивают лишь функции поддержания объема кровотока, осмотического давления, ионного баланса и в ряде случаев улучшают реологию кровотока, но газотранспортную функцию крови не осуществляют. *В результате в мировой науке свыше 30 лет назад возникли два научных направления: создание искусственной газотранспортной «крови» на гемоглобиновой или на перфторуглеродной основе.*

Уже несколько раз казалось, что вот-вот будет создан идеальный газотранспортный гемоглобиновый кровезаменитель (в печати появлялись сообщения о его создании), но при клинических испытаниях возникали проблемы, которые отбрасывали исследователей на исходные позиции. Сами по себе отдельные молекулы гемоглобина нельзя запустить в кровяное русло. Гемоглобин мгновенно будет связан белками плазмы, продукты его превращения поражают головной мозг и почки, перегружают клетки печени и селезенки - это патологическое состояние, аналогичное гемолитической анемии. Последствия такой гемоглобинурии и билирубинемии - не только желтушность, лихорадка, головные боли, боли в мышцах и суставах, но и тромбоз сосудов - развивается в конечном счете почечная недостаточность. Естественно появилась идея заключить гемоглобин в микрокапсулу. Четверть века пытались, 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. При этом возникает сильная аллергическая реакция.

Подобные трудности побудили разработчиков отказаться от микрокапсул и попытаться использовать свободный гемоглобин, но сшить отдельные молекулы химическими методами, создав полигемоглобиновые кристаллы. Чтобы сделать полигемоглобиновую упаковку устойчивой, ее сшивают глутаровым альдегидом, диимидоэфиром или другими агентами. Однако при сшивках, наряду с межмолекулярными, неизбежно возникают и внутримолекулярные сшивки. Последние ограничивают подвижность субъединиц молекулы гемоглобина и существенно

понижают или ликвидируют ее газотранспортные способности. Вот и приходилось создателям гемоглобиновых кровезаменителей лавировать: сильно сошьешь молекулы - ликвидируешь газотранспорт, слабо соединишь гемоглобины - они развалятся в кровотоке и приведут к тромбообразованию. Несмотря на все эти трудности, разработка модифицированного гемоглобина продолжалась, и оптимизм не покидал исследователей. Однако на сегодняшний день лишь один гемоглобиновый кровезаменитель (*гемопур*) прошел клинические испытания и применяется в ограниченных масштабах в Южной Африке. Он создан южно-африканской фирмой «Биопур». Возможно, что анонсированный компанией Уинслоу кровезаменитель MP4 также сможет пройти клинические испытания.

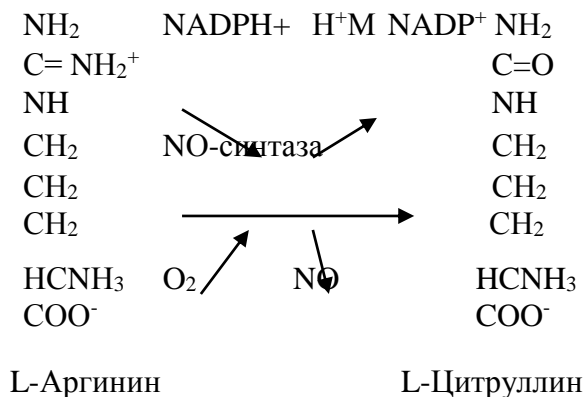
Мы в конце 70-х годов пошли по второму направлению - по пути создания синтетических кровезаменителей на основе перфторуглеродов, которые хорошо растворяют газы, до 50 объемных процентов кислорода. Для сравнения: вода растворяет порядка двух объемных процентов кислорода. *Перфторан* - это эмульсия, каждая частица которой состоит из *перфтордекалина* $C_{10}F_{18}$ (2/3 суммарной весовой композиции перфторуглеродов) и *перфторметилциклогексилпиперидина* $C_{12}F_{23}N$ (1/3 весовой композиции), а также *проксанола 268* (смеси оксиэтилена и оксипропилена), играющего роль поверхностно-активного вещества. Частички эмульсии имеют размер 0,03 - 1-0,15 мкм. *Перфторан* обеспечивает транспорт кислорода из легких в ткань организма за счет собственной кислородной емкости и своих реологических свойств (оптимальной вязкости, малого размера частичек и большой их суммарной поверхности) [1,2]. Наряду со многими клиническими применениями [3,4] (борьба с гипоксическими и ишемическими состояниями, консервация органов для трансплантации, защита миокарда при операциях на сухом сердце и т.д.) *перфторан* используется также и для улучшения микроциркуляции крови в капиллярах [5]. Препарат еще в 1995 году прошел все доклинические и клинические испытания и в настоящее время запатентован [6,7]. С 1997 года он выпускается как коммерческий препарат [8]. Более 20 тысяч пациентов по разным показаниям уже получили помощь в различных клиниках России, Украины, Казахстана и других стран с использованием этого препарата.

Вернемся к рассматриваемой статье в «New Scientist». Действительно, основная причина неэффективности кровезаменителей - спазм капилляров. В покое обычно потребляется не более 10 - 20% кислорода, содержащегося в крови, а остальная его часть циркулирует в артериально-венозном кровотоке. Причина состоит в закрытии значительной части капилляров - это обычное регуляторное явление. *Рост количества спазмированных капилляров резко возрастает при потере крови. У больных могут быть и другие причины ухудшения микроциркуляции крови (например, атероматозное поражение стенок микрососудов конечностей, приводящее к уменьшению просвета капилляров [5]).*

Чтобы открыть спазмированные капилляры, необходимо выполнить два условия: *снять спазм гладких мышц сосуда и оптимизировать артериальное давление на входе капилляра.* Первое достигается увеличением концентрации оксида азота (NO), второе - подбором оптимальной вязкости субстанции «*кровезаменитель - оставшаяся после потери кровь*».

Вторая половина XX века вошла в историю биологии открытием важной роли оксида азота в физиологии различных организмов [9,10]. Сегодня почти 50 тысяч статей посвящены медико-биологической роли этого соединения в организме. В 1998 году Р. Фурчготт (R. Furchgott), Л. Иннарро (L. Ignarro) и Ф. Мурад (F. Murad) были удостоены Нобелевской премии в области физиологии и медицины за выяснение роли

NO как сигнальной молекулы в регуляции сердечно-сосудистой системы. Известно, что оксид азота осуществляет и стимулирует многие процессы в организме [11,12], поэтому утверждение, что разработчики кровезаменителей об этом не знают, нам кажется маловероятным. Оксид азота как внутриклеточный мессенджер образуется при окислении L-аргинина гемовым белком – кальций-зависимой-NO-синтазой (NOS). В состав фермента входит гем, два флавиновых кофермента (FAD и FMN, H₄БП, а также ионы Zn.



Образование NO происходит во всех клетках и тканях. Обнаружены три изоферментных формы NO-синтазы: нейрональная и эндотелиальная - конститутивные ферменты, и индуцибельная, которая преобладает в печени, мышцах и миокарде.

NO - классический мессенджер: быстро диффундирует, является короткоживущим, легко пересекает мембрану и без участия рецепторов попадает в соседние клетки, активирует в них ряд процессов. В мышечных нейронах кишечной ткани nNOS активируется входом Ca²⁺. Образованный NO диффундирует в соседние гладкомышечные клетки, где активирует растворимую гуанилатциклазу. Образовавшийся cGMP активирует протеинкиназу PKG, что приводит к понижению уровня Ca²⁺ и расслаблению мышцы. Многие эффекты NO обусловлены cGMP и последующей активацией PKG. В сердечно-сосудистой ткани и в клетках эндотелия eNOS также активируется Ca²⁺, что приводит к расслаблению гладкой мускулатуры сосудов и уменьшению кровяного давления. В контексте нашего комментария эта функция NO наиболее важна.

Кроме того, NO-радикал участвует в регуляции скорости апоптоза, предотвращает агрегацию тромбоцитов и тромбоз, регулирует секрецию медиаторов и гормонов. Полагают, что он обладает антиканцерогенной активностью. При воспалении может образовываться избыток NO, который сопровождается образованием нитроксильных свободных радикалов, что приводит к повреждению тканей и микроорганизмов. При этом может возрастать вторичное повреждение клеток и тканей, расположенных вблизи очага воспаления.

Эмульсии перфторуглеродов, согласно Жану Риссу (J.Riess [11]), способны выступать в качестве резервуара NO, и тем самым доставлять его в места дефицита и убирать его избыток. Возможно, с этим связано, с одной стороны, вазодилатационное и реологическое действия *перфторана*, а с другой - его противовоспалительные эффекты. В отличие от *перфторана* большинство полигемоглобиновых переносчиков прочно связывают NO и вызывают в связи с этим спазм сосудов.

Чтобы раскрыть капилляр, помимо расслабления гладкой мускулатуры, сосуда необходимо также оптимизировать давление и вязкость жидкости на входе капилляра.

Напомним, что все суспензии и эмульсии (в том числе и кровь) являются неньютоновскими жидкостями, а условия их течения в пульсирующих потоках нельзя считать пуазейлевскими. В отличие от гомогенных жидкостей, например, от чистой воды или солевого раствора (ньютоновской жидкости), они сжимаются при приложении к ним давления. Находящиеся в жидкости микрочастицы скользят (сдвигаются) относительно друг друга с некоторой скоростью сдвига. Неньютоновские жидкости обладают инерционностью, т.е. начинают течь, если давление становится выше определенной критической величины, а при меньших давлениях ведут себя как упругие тела. Вязкость таких жидкостей определяется размерами, формой и поверхностными свойствами наполняющих их микрочастиц, трением этих частиц друг о друга (и о стенки сосуда) и скоростью их сдвига. Чем меньше величина вязкости, тем, с одной стороны, меньше затраты энергии на проталкивание жидкости в крупных сосудах, но одновременно труднее раскрыть капилляры (эффект Фареуса-Линдквиста). Жидкость должна быть достаточно вязкой, чтобы при приложении к ней пульсирующего давления капилляры постепенно раскрылись. Вязкость *перфторана* составляет 2,5 сП (сантипуаз), а средняя вязкость крови - 3 ± 7 сП. Вязкость крови зависит от гематокрита, состава белков плазмы, состояния мембран эритроцитов и образующихся из них при движении структур. Это хорошо исследовано и давно известно [12-14].

Частички перфторуглерода, размер которых в 100 раз меньше размера эритроцита, могут проникать в спазмированные микрососуды, облегчая их раскрытие. При этом улучшается микроциркуляция крови. Этот процесс можно контролировать по изменению температуры ткани после введения *перфторана* с помощью тепловизионной техники [5]. Вязкость *перфторана* ниже, чем вязкость цельной крови, поэтому при кровезамещениях вязкость системы понижается, но незначительно. Остаточная величина вязкости системы «*перфторан* + *оставшаяся кровь*» обеспечивает полноценное раскрытие капилляров.

Что касается препарата МР4, анонсированного в комментируемой статье, то это еще не коммерческий препарат, а только научная разработка, и этому кровезаменителю еще предстоит пройти клинические испытания в полном объеме. Остается пожелать нашим американским коллегам успеха на этом нелегком пути.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иваницкий Г.Р., Воробьев С.И. // Вестн. РАН. 1997. Т. 67. № II. С. 998-1008.
2. Иваницкий Г.Р. // Биофизика. 2001. Т. 46, № I. С. 5-33.
3. Мороз В.В., Крылов Л.Н., Иваницкий Г.Р. и др. // Анестезиология и реаниматология. 1995. № 6. С. 12-17.
4. *Moroz V.V., Krylov N.L., Onishchenko N.A. et al. // IV CJBSR, Fourth International Symposium on Current Issues in Blood Substitute Research, Stockholm, 2002, 5-8 June, SYLLABUS. P. 19.*
5. Иваницкий Г.Р., Деев А.А., Маевский Е.И. и др. // ДАН. 2003. Т. 393, № 3. С. 419-423.
6. Ivanitsky G.R., Maevsky E.I. et al // Emulsion of perfluoroorganic compounds for medical purposes, a process for the preparation thereof and methods for treating and preventing diseases with the use thereof. Patent No.: US 6,562,872 B1. Date of Patent: May 13, 2003.
7. Ivanitsky G.R., Maevsky E.I. et al. // European Patent № 00970349.7-2I12-RU0000309. Date of filing: 20.07.00. Notification of the data mentioned in Article 128(5) EPC pursuant to Rule 17(3) EPC from 26.02.03.
8. Сайт научно-производственной фирмы «Перфторан» в интернете: www.perftoran.ru

9. Ванин А.Ф., Налбалдян Р.Н. // Биофизика. 1965. Т. 10, вып. I. С. 167.
10. Шумаев К.Б., Заббарова И.В., Рууге Э.К., Ванин А.Ф. // Биофизика. 2003. Т. 48, вып. 1. С. 5-10.
11. Уразаев А.Х., Зефирова А.Л. // Успехи физиол. наук. 1999. Т. 30, № I. С. 54-72.
12. Серая И.П., Нарциссов Я.Р. // Успехи биол. наук. 2002. Т. 122, № 3. С. 249-258.
3. Riess J.G. // Chemical Reviews. 2001. V. 101. P. 2797-2919.
14. Чижевский А.Л. // Структурный анализ движущейся крови. М.: Изд-во АН СССР, 1959.
15. Лайтфут Э. // Явление переноса в живых системах. М.: МИР, 1977.
16. Каро К., Педли Т., Шротер Р., Сид У. // Механика кровообращения. М.: Мир, 1981.

**New Artificial Blood: Sensation without any Sensation
(Comments to the article in the Journal New Scientist of 13 March, 2004)**

G.R. Ivanitskii and E.I. Maevskii

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics. Russian Academy of Sciences,
Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

In the article of Sylvia P. Westphal «New artificial blood shows promise» the sensational, at first sight, contention is adduced that numerous researchers engaged in the development of artificial blood substituents have many years followed the false pathway and did not understand the mechanisms of action of gas-transporting blood substituents, and now this understanding is available. In the paper being commented, the author gives three criteria that gas-transporting blood substituents must meet. The statement that the developers of gas-transporting blood substituents were unaware of these criteria is, in our opinion, questionable. We have known and have taken them into account development of the Russian gas-transporting blood substituent perftoran.

Key words: artificial blood, perfluorocarbons, nitric oxide, perftoran