

UDC 616.15

DOI: 10.58407/bht.1.25.5



Copyright (c) 2025 Małgorzata Gradziuk, Halina Tkaczenko, Natalia Kurhaluk

Ця робота ліцензується відповідно до [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) / This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).**Małgorzata Gradziuk, Halina Tkaczenko, Natalia Kurhaluk****WYZWANIA I MOŻLIWOŚCI W TWORZENIU SZTUCZNEJ KRWI****Małgorzata Gradziuk, Halina Tkaczenko, Natalia Kurhaluk****CHALLENGES AND OPPORTUNITIES  
IN ARTIFICIAL BLOOD****STRESZCZENIE**

**Cel pracy:** Celem niniejszej pracy jest przedstawienie aktualnego stanu badań nad sztuczną krwią, jej potencjalnymi zastosowaniami klinicznymi oraz przyszłymi kierunkami rozwoju. Problem niedoboru krwi w bankach krwi oraz rosnące zapotrzebowanie na transfuzje stanowią istotne wyzwanie dla współczesnej medycyny. W związku z tym, naukowcy na całym świecie podejmują próby opracowania skutecznych substytutów krwi, które mogłyby pełnić rolę transportera tlenu w organizmie oraz ograniczyć zależność od tradycyjnych dawców. W pracy omówiono różne strategie syntezy sztucznej krwi, uwzględniając postępy w zakresie biotechnologii, inżynierii biomedycznej oraz nanotechnologii. Szczególny nacisk położono na badania nad nośnikami hemoglobiny oraz syntetycznymi erytrocytami.

**Metody wykorzystania źródeł literaturowych.** Aby uzyskać rzetelne i kompleksowe informacje dotyczące rozwoju substytutów krwi, dokonano przeglądu dostępnej literatury naukowej, obejmującego bazy danych takie jak PubMed, Scopus, Web of Science oraz Google Scholar. Analizowane źródła obejmowały artykuły naukowe, raporty z badań klinicznych, przeglądy systematyczne oraz doniesienia o najnowszych technologiach w dziedzinie inżynierii biomedycznej. W pracy omówiono różne typy substytutów krwinek czerwonych, koncentrując się na hemoglobinie izolowanej z różnych źródeł (np. hemoglobina rekombinowana, hemoglobina bezkręgowców), syntetycznych mikrocząsteczkach naśladujących erytrocyty oraz nowoczesnych nośnikach tlenowych. Szczególną uwagę poświęcono wynikom badań klinicznych, które dostarczają informacji na temat bezpieczeństwa, skuteczności i potencjalnych ograniczeń tych rozwiązań.

**Nowatorstwo naukowe.** Artykuł wnosi istotny wkład w rozwój wiedzy na temat sztucznej krwi, prezentując kompleksowe spojrzenie na jej potencjał oraz wyzwania związane z jej zastosowaniem w praktyce klinicznej. Podkreślono kluczowe kwestie, takie jak skuteczność substytutów krwi w porównaniu z naturalną krwią ludzką, ich biodostępność, stabilność oraz możliwe skutki uboczne. Ponadto, zwrócono uwagę na koszty produkcji oraz stopień akceptacji tego rodzaju produktów przez środowisko medyczne i pacjentów. W pracy wskazano również na konieczność dalszych badań oraz rozwoju innowacyjnych technologii, które mogą przyczynić się do zwiększenia dostępności i bezpieczeństwa sztucznej krwi. Omówiono także potencjalne kierunki przyszłych badań, takie jak wykorzystanie nanotechnologii, bioinżynierii oraz biomateriałów do opracowania bardziej efektywnych i bezpiecznych substytutów krwi.

**Wnioski.** Rozwój sztucznych substytutów krwinek czerwonych może stać się przełomem w medycynie ratunkowej oraz w sytuacjach, w których tradycyjne transfuzje są niemożliwe lub utrudnione (np. w warunkach pola walki, klęsk żywiołowych, w miejscach o ograniczonym dostępie do krwi). Pomimo wieloletnich badań i postępu technologicznego, wiele substytutów krwi napotyka na trudności związane z ograniczoną stabilnością, potencjalną toksycznością oraz zdolnością do efektywnego transportu tlenu. Istniejące produkty, które przeszły testy kliniczne, wykazują obiecujące właściwości, jednak wciąż pozostają dalekie od pełnego zastąpienia naturalnej krwi. Wyniki badań wskazują, że dalsze prace nad udoskonaleniem sztucznej krwi powinny koncentrować się na poprawie bezpieczeństwa, wydłużeniu okresu przechowywania oraz optymalizacji kosztów produkcji. Perspektywy w tej dziedzinie są obiecujące, a przyszłe osiągnięcia mogą zrewolucjonizować leczenie pacjentów wymagających transfuzji krwi oraz przyczynić się do poprawy dostępności opieki zdrowotnej na całym świecie.

**Słowa kluczowe:** sztuczna krew, substytuty krwi, zastosowania kliniczne, nośniki hemoglobiny, tlenowe środki terapeutyczne, perfluorowęglowodory (PFC), nośniki tlenu na bazie hemoglobiny

## ABSTRACT

**Purpose:** The aim of this study is to present the current state of research on artificial blood, its potential clinical applications and future directions for development. The shortage of blood in blood banks and the increasing demand for transfusions is a major challenge for modern medicine. As a result, scientists worldwide are working to develop effective blood substitutes that could act as oxygen carriers in the body and reduce dependence on traditional donors. This study discusses various strategies for synthesising artificial blood, taking into account advances in biotechnology, biomedical engineering and nanotechnology. Particular emphasis is placed on research into haemoglobin carriers and synthetic erythrocytes.

**Materials and methods.** To obtain reliable and comprehensive information on the development of blood substitutes, a review of the available scientific literature was conducted, including databases such as PubMed, Scopus, Web of Science and Google Scholar. Sources analysed included scientific articles, clinical trial reports, systematic reviews and reports on the latest technologies in biomedical engineering. The study discusses different types of red blood cell substitutes, focusing on haemoglobin isolated from different sources (e.g. recombinant haemoglobin, invertebrate haemoglobin), synthetic microparticles that mimic erythrocytes, and modern oxygen carriers. Special attention has been given to the results of clinical trials that provide information on the safety, efficacy and potential limitations of these solutions.

**Scientific novelty.** This article makes a significant contribution to the knowledge of artificial blood by providing a comprehensive overview of its potential and the challenges associated with its clinical application. Key issues such as the efficacy of blood substitutes compared to natural human blood, their bioavailability, stability and potential side effects are highlighted. It also looks at production costs and the acceptance of such products by the medical community and patients. The study also highlights the need for further research and the development of innovative technologies that could improve the availability and safety of artificial blood. Potential future research directions are discussed, including the use of nanotechnology, bioengineering and biomaterials to develop more efficient and safer blood substitutes.

**Conclusions.** The development of artificial red blood cell substitutes could be a breakthrough in emergency medicine and in situations where traditional transfusions are impossible or difficult to perform (e.g., in combat situations, natural disasters, or locations with limited blood supply). Despite years of research and technological advances, many blood substitutes face challenges related to limited stability, potential toxicity and the ability to effectively transport oxygen. Existing products that have undergone clinical trials show promising properties, but are still far from fully replacing natural blood. Research suggests that further work to improve artificial blood should focus on improving safety, extending shelf life and optimising production costs. The outlook in this field is promising, and future advances could revolutionise the treatment of patients requiring blood transfusions and contribute to improved access to healthcare worldwide.

**Key words:** artificial blood, blood substitutes, clinical applications, haemoglobin carriers, oxygen therapeutic agents, perfluorocarbons, hemoglobin-based oxygen carriers

## Wprowadzenie

Współczesna medycyna stoi przed ogromnym wyzwaniem, jakim jest zapewnienie odpowiednich ilości krwi do transfuzji. Niedobór krwi, wynikający z malejącej liczby dawców, starzejącego się społeczeństwa oraz rosnących potrzeb klinicznych, zmusza naukowców do poszukiwania alternatywnych rozwiązań. Jednym z najbardziej obiecujących kierunków badań jest rozwój sztucznej krwi – substancji, która mogłaby zastąpić krew ludzką w procesach ratowania życia i leczenia (Seifried and Mueller, 2011; Gasparovic Babic et al., 2024).

Idea sztucznej krwi nie jest nowa. Już w XX wieku rozpoczęto prace nad substytutami, które mogłyby pełnić funkcję transportu tlenu, ale dopiero niedawne osiągnięcia w dziedzinie bioinżynierii i nanotechnologii otworzyły nowe możliwości w tej dziedzinie. Sztuczna krew ma szansę nie tylko uzupełnić braki krwi w szpitalach, lecz także stać się niezastąpionym

narzędziem w sytuacjach nagłych, takich jak klęski żywiołowe, wojny czy odległe misje kosmiczne (Sarkar, 2008).

Celem niniejszego artykułu jest przegląd aktualnych osiągnięć naukowych oraz analiza perspektyw rozwoju tej przełomowej technologii. W pierwszej części przybliżono skład sztucznej krwi i jej rodzaje, następnie omówiono obecny stan badań oraz wyzwania technologiczne, które wymagają pokonania. W ostatniej części przedstawiono potencjalne korzyści oraz przyszłe kierunki rozwoju, które mogą uczynić sztuczną krew powszechnym rozwiązaniem w medycynie.

**Znaczenie krwi w organizmie i wyzwania związane z jej niedoborem.** Krew pełni fundamentalną rolę w utrzymaniu życia i zdrowia człowieka. Jedną z jej kluczowych funkcji jest transportowanie tlenu z płuc do wszystkich tkanek organizmu. Tlen nie tylko warunkuje życie, ale także zapewnia prawidłowy przebieg procesów fizjologicznych w ludzkim ciele (Rhodes et al., 2024). Utrata krwi

lub niedokrwistość mogą prowadzić do niedotlenienia, co negatywnie wpływa na funkcjonowanie narządów, zwłaszcza mózgu, serca i tkanek. W skrajnych przypadkach skutkuje to trwałymi uszkodzeniami, a nawet zgonem. Dlatego zapewnienie odpowiedniej podaży tlenu do tkanek stanowi niezbędną element podtrzymania funkcji życiowych organizmu (Macciò and Madeddu, 2012).

Każdego dnia na całym świecie wielu pacjentów wymaga transfuzji krwi z różnych przyczyn. Niestety, jednym z istotnych wyzwań systemów opieki zdrowotnej pozostaje ograniczona dostępność krwi i jej składników w momentach, gdy są one najbardziej potrzebne. Mimo wieloletnich badań oraz dynamicznego rozwoju medycyny i technologii, skuteczna metoda wytwarzania sztucznej krwi wciąż nie została opracowana. Współcześnie jedynym jej źródłem pozostaje organizm ludzki (Niechwiadowicz-Czapka i Klimczyk, 2011; Osaro and Charles, 2011).

W ostatnich latach obserwuje się jednak znaczny spadek liczby honorowych dawców krwi. Według zaleceń Światowej Organizacji Zdrowia, aby zapewnić odpowiednie rezerwy krwi w danym kraju, regularne jej oddawanie powinno obejmować 2–2,5 % populacji (Guidelines Review Committee, 2010). Tymczasem w Polsce wskaźnik ten wynosi zaledwie 1,9 %, podczas gdy w Stanach Zjednoczonych sięga aż 7% (Makowicz et al., 2022). Za taki stan rzeczy odpowiada m.in. starzejące się społeczeństwo oraz rozpowszechnione mity dotyczące oddawania krwi, które mogą zniechęcać potencjalnych dawców. Wśród najczęściej powtarzanych błędnych przekonań znajdują się m.in. obawa przed uzależnieniem się od oddawania krwi, lęk przed nadprodukcją krwi przy jej regularnym oddawaniu oraz przekonanie, że może to prowadzić do rozwoju nadciśnienia (Kozłowska and Kempa, 2011).

Współczesna medycyna coraz bardziej potrzebuje krwi i jej składników, zwłaszcza w leczeniu chorób nowotworowych, po operacjach kardiochirurgicznych oraz w transplancjologii. Niemniej jednak, pozyskanie nowych dawców stanowi istotne wyzwanie (Thomson et al., 2009; Gasparovic Babic et al., 2024). Dodatkowo, coraz częściej odnotowywane są przypadki niepożądanych reakcji po transfuzjach krwi, a także pojawiają się nowe czynniki zakaźne przenoszone drogą krwi (Dellinger and Anaya, 2004; Bloch et al., 2012). Wszystkie te czynniki stanowią silne argumenty, które skłaniają naukowców do nieustannych

poszukiwań alternatywnych rozwiązań dla ludzkiej krwi.

**Historia, wyzwania i perspektywy rozwoju substytutów krwi.** W historii medycyny istniała potrzeba opracowania substytutów krwi od czasów, gdy pacjenci umierali z powodu poważnych ran. Pierwsze zapisy dotyczące transfuzji krwi pochodzą od starożytnych Inków. Jednak dopiero w 1616 roku William Harvey opisał krążenie krwi, co stało się podstawą dalszych prób zastąpienia krwi innymi substancjami, takimi jak piwo, mocz, mleko, żywice roślinne czy krew owiec. W XVIII wieku eksperymenty z substytutami krwi, takimi jak mleko czy sól fizjologiczna, miały ograniczoną skuteczność i były porzucane z powodu wątpliwej efektywności lub skutków ubocznych (Sarkar, 2008).

Badania nad alternatywami dla krwi rozpoczęły się około 150 lat temu. W poszukiwaniu substytutu krwi T. Gaillard Thomas zaproponował wstrzykiwanie mleka krowiego dożylnie, co określił jako „iniekcje mleczne” (Thomas, 1878). Swoją hipotezę uzasadniał podobieństwami chemicznymi pomiędzy chłonką a mlekiem, podkreślając, że oba są emulsjami tłuszczowymi zawieszonymi w płynie. Thomas przedstawił trzy studia przypadków pacjentów w stanie agonalnym, którym podał około 8 uncji świeżego mleka krowiego. Jeden z pacjentów przeżył, a dwóch zmarło. Śmierć tych pacjentów przypisał innym komplikacjom, niezwiązanym z iniekcjami mlecznymi, argumentując, że były one bezpieczne pod warunkiem użycia świeżego mleka (Chen et al., 2009).

Pomimo twierdzeń Thomasa, rozwój substytutów krwi skoncentrował się na tworzeniu roztworów hemoglobiny, które po raz pierwszy były testowane klinicznie na początku XX wieku. Charakterystyka hemoglobiny jako nośnika tlenu czyniła ją logicznym wyborem dla substytutów krwi, jednak jej stosowanie wiązało się z nieoczekiwanymi konsekwencjami (Chen et al., 2009). Amberson i współpracownicy (1933) przeprowadzili eksperymenty na kotach, całkowicie zastępując ich krew hemoglobiną wolną od komórek rozpuszczoną w roztworze Ringera z mleczanami. Wykazali, że roztwór ten mógł podtrzymać życie, jednak korzyści były krótkotrwałe, a leczenie powodowało poważne uszkodzenia nerek. Mimo tych obserwacji przeprowadzono badania kliniczne z użyciem hemoglobiny w roztworze Ringera, które niestety doprowadziły do znacznych dysfunkcji nerek u 5 z 14 pacjentów. W rezultacie Amber-

son i współpracownicy zaniechali dalszych badań, dochodząc do wniosku, że roztwory hemoglobiny wymagają dalszego rozwoju z uwagi na ich toksyczność nerkową i indukcję nadciśnienia naczyniowego (Chen et al., 2009).

W 1883 roku odkrycie roztworu Ringer'a, który mógł przywrócić ciśnienie krwi, stanowiło ważny krok w rozwoju sztucznej krwi, choć nie zastępował on działania czerwonych krwinek. Dopiero w XX wieku, dzięki pracy Karla Landsteinerja nad klasyfikacją grup krwi, transfuzje stały się bezpieczniejsze, a system krwiodawstwa został wprowadzony na szeroką skalę (Sarkar, 2008).

W latach 50. XX wieku Marynarka Wojenna Stanów Zjednoczonych leczyła 47 anemicznych i gorączkujących marynarzy, podając im jeden lub więcej wlewów roztworów hemoglobiny. U 17 marynarzy wystąpiło nadciśnienie, a 12 z 52 wlewów wywołało objawy problemów z nerkami. U pozostałych marynarzy, którzy nie mieli problemów z nerkami, wystąpiły inne działania niepożądane. Toksyczność nerkowa była prawdopodobnie spowodowana zatkaniami kanalików nerkowych przez hemoglobinę i błonę stromalną erytrocytów, upośledzeniem funkcji nerek związanym z odkładaniem pigmentu hemowego oraz zmniejszeniem przepływu krwi przez nerki na skutek wazokonstrykcji indukowanej hemoglobiną (Winslow, 1992).

Z powodu dowodów na toksyczność nerkową roztworów hemoglobiny zainteresowanie nimi zmalało i minęło kilka lat, zanim opracowano użyteczne roztwory hemoglobiny wolnej od stromalnych zanieczyszczeń. Techniki ultraczyszczenia, pozwalające na usunięcie stromy i innych pozostałości komórkowych, w dużej mierze rozwiązały problem toksyczności nerek. Jednak pojawiły się nowe wyzwania. Naturalna hemoglobina tetrameryczna, po usunięciu z erytrocytów, rozpada się na dimery, które są szybko usuwane przez filtrację kłębuszkową, co skutkuje krótkim okresem półtrwania w naczyniach. Dodatkowo wolna hemoglobina ma ograniczony kontakt z fosforanami, co powoduje przesunięcie krzywej  $P_{50}$  w lewo, skutkując wysokim powinowactwem do tlenu i ograniczoną zdolnością jego uwalniania (Chen et al., 2009).

Aby pokonać te ograniczenia, zastosowano różne podejścia do stabilizacji molekularnej i chemicznej modyfikacji hemoglobiny. Pod koniec lat 60. badacze z Armii Stanów Zjednoczonych opracowali nowy obiecujący

roztwór hemoglobiny. Bunn i Jandl (1968) zastosowali sieciowanie hemoglobiny za pomocą bis (N-maleimidometylowego) eteru (BME), co wydłużyło jej czas retencji wewnątrznaczyniowej. Sieciowanie zmniejszyło tendencję hemoglobiny do tworzenia dimerów, co ograniczyło jej filtrację nerkową i usuwanie (Bunn and Jandl, 1968).

Inni badacze modyfikowali hemoglobinę chemicznie w miejscach wiązania 2,3-DPG, grupach aminowych czy wewnętrznych strukturach w celu zapobieżenia jej rozpadowi na dimery  $\alpha\beta$  i przywrócenia wartości  $P_{50}$  do poziomu zbliżonego do normalnego (Winslow, 2006a,b). Bosen i współpracownicy (1975) zastosowali inny sposób – polimeryzację hemoglobiny z użyciem glutaraldehydu, co wydłużyło jej czas retencji wewnątrznaczyniowej. Kolejną metodą było przyłączenie hemoglobiny do większych cząsteczek, co pozwalało na jej dłuższe pozostawanie w układzie naczyniowym w porównaniu z hemoglobiną niemodyfikowaną. W jednym z badań wykazano, że hemoglobina połączona z dekstranem podtrzymywała życie psów i kotów w warunkach braku erytrocytów (Tam et al., 1976, 1978).

Badania nad substytutami krwi wznowiono po II wojnie światowej, kiedy to zaczęto stosować osocze ludzkie w transfuzjach. W 1966 roku pojawiła się koncepcja wykorzystania związków perfluorokarbonowych (PFC) jako substytutów krwi. Choć badania nad nimi były obiecujące, to system krwiodawstwa rozwinięty w krajach rozwiniętych zmniejszył zainteresowanie dalszymi badaniami. Wzrost zainteresowania nastąpił po wojnie w Wietnamie, kiedy to odkryto, że transfuzje mogą przekazywać HIV i wirusowe zapalenie wątroby, co spowodowało intensyfikację poszukiwań nowych syntetycznych nośników tlenu (Sarkar, 2008).

**Krew i jej substytuty: kluczowa rola, właściwości i nowoczesne rozwiązania terapeutyczne.** Krew odgrywa fundamentalną rolę w organizmach żywych, zapewniając transport tlenu z płuc do tkanek oraz dwutlenku węgla z tkanek do płuc. Główną funkcję w tym procesie pełnią czerwone krwinki, które naturalnie wiążą tlen i transportują go do komórek. Zdolność ta wynika z obecności hemoglobiny w erytrocytach – tetramerycznego białka zdolnego do odwracalnego wiązania tlenu oraz dwutlenku węgla. Hemoglobina składa się z dwóch łańcuchów polipeptydowych  $\alpha$  (1 i 2) oraz dwóch łańcuchów  $\beta$  (1 i 2), z

których każdy zawiera grupę hemową z atomem żelaza, umożliwiającą wiązanie jednej cząsteczki tlenu (Chen et al., 2009; Khan et al., 2020).

Krew, często uważana za esencję życia, pełni wiele istotnych funkcji fizjologicznych dzięki składnikom osocza i komórkom. Transportuje tlen oraz składniki odżywcze do tkanek, a także usuwa produkty przemiany materii. Białe krwinki (granulocyty oraz limfocyty B i T) pełnią kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej, natomiast płytki krwi, czynniki krzepnięcia i fibrynolizy są niezbędne do utrzymania równowagi pomiędzy tworzeniem a rozkładem skrzepów. Krew transportuje również hormony i odgrywa ważną rolę w utrzymaniu równowagi pH, która musi być precyzyjnie regulowana na poziomie 7,40 (InformedHealth.org, 2006).

Dojrzałe ludzkie erytrocyty charakteryzują się dwuwklęsłym kształtem dysku oraz brakiem organelli, co wyróżnia je na tle innych

komórek ssaków. Pomimo braku pełnego układu energetycznego i genetycznego, erytrocyty żyją około 120 dni i pełnią istotną rolę w transporcie tlenu do tkanek. Ich dwuwklęsły kształt, wynikający z wysokiego stężenia hemoglobiny i braku jądra, zapewnia większą elastyczność oraz powierzchnię wymiany gazowej, co umożliwia efektywniejszy transport tlenu i dwutlenku węgla (Mohandas and Gallagher, 2008; Zhang et al., 2024).

Błona komórkowa erytrocytów odpowiada za ich właściwości mechaniczne, transportowe i antygenowe. Hemoglobina w błonie transportuje gazy oddechowe, a erytrocyty powstają z komórek macierzystych w szpiku kostnym. Śledziona i wątroba pełnią kluczowe role w metabolizmie erytrocytów, filtrując zużyte komórki i recyklingując żelazo (Zhang et al., 2024).

Cechy charakterystyczne krwinek czerwonych zostały przedstawione na ryc. 1.



Ryc. 1. Cechy charakterystyczne krwinek czerwonych  
(Źródło: Mohandas and Gallagher, 2008; Zhang et al., 2024)

Substytuty krwi, mimo swojej nazwy, nie stanowią pełnowartościowego zamiennika krwi. Zostały zaprojektowane wyłącznie w celu wsparcia jednej konkretnej funkcji terapeutycznej, jaką jest transport tlenu do tkanek. Dlatego też bardziej trafne jest określanie ich mianem „terapeutycznych środków tlenowych” (ang. *oxygen therapeutic agents*, OTAs) (Chen et al., 2009; Khan et al., 2020).

Aby substytuty krwi mogły być skuteczne i bezpieczne w zastosowaniach klinicznych, muszą spełniać określone kryteria (ryc. 2).

Obecnie badania nad substytutami krwi koncentrują się na trzech głównych obszarach (ryc. 3):

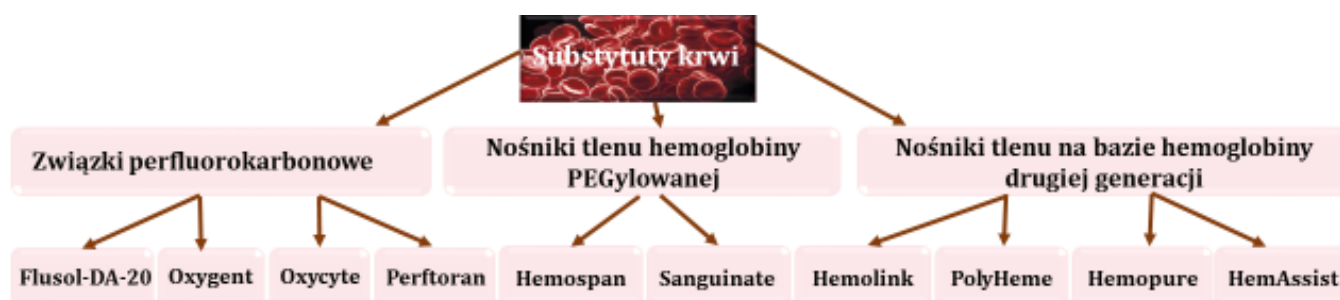
- Syntetyczne nośniki tlenu, takie jak związki perfluorokarbonowe (Haldar et al., 2019; Jägers et al., 2021).

- Nośniki tlenu oparte na hemoglobinie, wytwarzane z hemoglobiny uzyskanej z krwinek czerwonych (Jansman and Hosta-Rigau, 2018; Faggiano et al., 2022).

Sztuczne krwinki czerwone, które mają potencjał, by zastąpić naturalne erytrocyty w procesie transportu tlenu (Azuma and Sakai, 2019; Waeterschoot et al., 2024).



Ryc. 2. Kryteria skuteczności i bezpieczeństwa substytutów krwi w zastosowaniach klinicznych (Źródło: Winslow, 2002; Tappenden, 2007; Jahr et al., 2021; Chen et al., 2023)



Ryc. 3. Główne obszary badań nad substytutami krwi (Źródło: Khan et al., 2020)

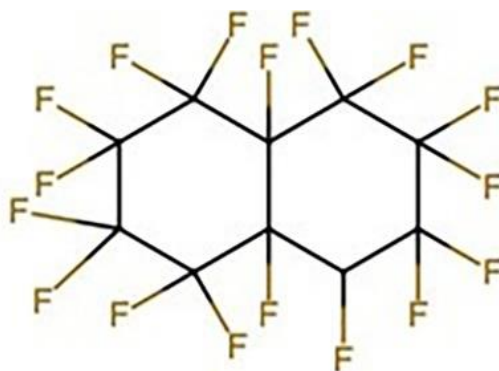
**Rodzaje i skład sztucznej krwi.** Sztuczna krew stanowi obiecującą alternatywę dla krwi ludzkiej, która może być wykorzystywana w sytuacjach kryzysowych, takich jak masowe wypadki, operacje medyczne czy niedobory krwi w bankach krwi. Obecnie badania nad sztuczną krwią koncentrują się na różnych podejściach technologicznych i biologicznych, których celem jest odwzorowanie podstawowych funkcji krwi (Sarkar, 2008; Haldar et al., 2019). Poniżej przedstawiono główne rodzaje sztucznej krwi oraz jej skład.

### 1. Syntetyczne nośniki tlenu oparte na perfluorokarbonach (PFCs)

Perfluorowęglowodory (PFC) zostały po raz pierwszy opisane jako nośniki tlenu przez Clarka i Gollana w 1966 roku, którzy wykazali, że myszy mogą przeżyć w roztworze PFC wzbogaconym tlenem (Clark and Gollan,

1966). PFC to syntetyczne cząsteczki zbudowane z atomów węgla i fluoru, które tworzą silne wiązania chroniące przed degradacją chemiczną (ryc. 4).

Dzięki właściwościom hydrofobowym PFC muszą być stabilizowane w emulsjach do użytku dożylnego. W takiej postaci PFC doskonale rozpuszczają gazy, co wynika z niskiej polaryzowalności fluoru i słabych oddziaływań międzycząsteczkowych (Lowe, 1999; Riess, 2005). Wykazują wyjątkowo małe rozmiary – około 100 razy mniejsze niż erythrocyty – oraz zdolność do transportu tlenu i dwutlenku węgla bez ich chemicznego wiązania. Ich najważniejszą właściwością jest zdolność do rozpuszczania gazów, wynosząca 20-25 razy więcej niż w przypadku wody lub osocza, przy czym proces ten zachodzi pasywnie, bez udziału reakcji chemicznych (Lane, 1995; Cohn and Cushing, 2009).



Ryc. 4. Struktura nośnika tlenu na bazie perfluorowęglowodorów  
(Źródło: Khan et al., 2020)

PFC rozpuszczają tlen i dwutlenek węgla efektywnie dzięki zasadzie Henry'ego, która mówi, że stężenie rozpuszczonego gazu jest proporcjonalne do jego ciśnienia cząstkowego. W przeciwieństwie do hemoglobiny, która wymaga wiązań chemicznych do transportu tlenu, PFC umożliwiają szybkie i efektywne uwalnianie gazów w razie potrzeby, niezależnie od temperatury i warunków środowiskowych (Biro and Blais, 1987; Shi et al., 2009).

PFC mają liniową zależność między poziomem rozpuszczonego tlenu a jego ciśnieniem, co oznacza, że do maksymalnej zdolności przenoszenia tlenu konieczne jest wysokie ciśnienie tlenu. Dzięki zastąpieniu atomów wodoru atomami fluoru, PFC są nierozpuszczalne w wodzie i nieulegające metabolizmowi, co wynika z silnych wiązań węgiel-fluor. W zastosowaniach klinicznych wymagają one emulgatorów, aby stały się rozpuszczalne (Riess, 2005).

PFC stanowią atrakcyjną alternatywę dla osób odmawiających transfuzji krwi lub białek pochodzenia ludzkiego czy zwierzęcego. Rozpuszczają tlen w stężeniu 40–50 %, czyli 20 razy więcej niż w wodzie i dwa razy więcej niż w osoczu. Ponadto rozpuszczają 130–160 ml dwutlenku węgla, co przewyższa zdolność wody 2–3 razy (Shi et al., 2009). Niektóre PFC, takie jak FC-80, mają zdolności rozpuszczania tlenu wyższe niż erytrocyty (o 10%).

Podstawowa różnica między transferem tlenu przez hemoglobinę (Hb) a PFC polega na tym, że Hb wiąże tlen chemicznie, podczas gdy PFC go rozpuszczają (Cohn and Cushing, 2009). PFC są odporne na wysokie temperatury (nawet 300°C), co umożliwia ich łatwą sterylizację cieplną (Cabrales and Intaglietta, 2013). Dzięki niewielkim rozmiarom mogą przechodzić przez naczynia zablokowane w niektórych chorobach, gdzie erytrocyty nie mogą się przemieszczać, co

poprawia proces dotlenienia tkanek (Moradi et al., 2016).

Badania *in vitro* wykazały, że PFC jako sztuczna krew są szczególnie użyteczne w przypadku zablokowanych tętnic wieńcowych, pomagając w utrzymaniu funkcji mięśnia sercowego (Mushlin et al., 1985). Dodatkowo badania przeprowadzone przez Chena i innych (2013) pokazały skuteczność PFC w roli substytutu krwi podczas operacji związanych z leczeniem urazowych i krwotocznych wstrząsów, także u ofiar wojennych.

Stabilność molekularna, zdolność do rozpuszczania gazów oraz unikalne właściwości fizykochemiczne czynią PFC obiecującymi kandydatami do zastosowań biomedycznych. Dzięki fluorowanym wiązaniom, PFC wykazują wyjątkowe cechy, które wyróżniają je spośród innych związków organicznych i mogą stanowić podstawę innowacyjnych rozwiązań medycznych (Khan et al., 2020; Kakaie et al., 2023).

Metabolizm PFC polega głównie na ich wydalaniu przez płuca wraz z powietrzem wydychanym, a częściowo przez fagocyty układu siateczkowo-śródbłonkowego, zwłaszcza w śledzionie i wątrobie. Cząsteczki PFC, zawieszone w osoczu, przemieszczają się pomiędzy krwinkami czerwonymi i w pobliżu ścian naczyń krwionośnych. W płucach wiążą tlen, który następnie uwalniają w tkankach na drodze dyfuzji (Haldar et al., 2019).

PFC są stosunkowo tanie w produkcji, co można osiągnąć bez użycia materiału biologicznego, eliminując tym samym ryzyko przeniesienia chorób zakaźnych przez transfuzję krwi. Niemniej jednak, istnieją dwie główne przeszkody technologiczne ograniczające ich kliniczne zastosowanie. Po pierwsze, są nierozpuszczalne w wodzie, co wymaga stosowania emulgatorów – tłuszczowych związków lipidowych umożliwiających zawieszenie

drobnych cząsteczek PFC we krwi. Po drugie, ich zdolność do przenoszenia tlenu jest mniejsza niż w przypadku produktów opartych na hemoglobinie, co oznacza konieczność ich stosowania w większych ilościach (Sarkar, 2008).

Emulsje perfluorokarbonowe I i II generacji (Moradi et al., 2016; Khan et al., 2020):

1. Fluosol (Green Cross, Japonia);
2. Perftoran (Perftoran, Rosja);
3. Oxygent (Chiny);
4. PHER-O2 (Sanguine Corp.);
5. Oxycyte (Synthetic Blood International).

Zalety i wady emulsji perfluorokarbonowych zostały przedstawione w Tabeli 1.

Tabela 1

### Zalety i wady emulsji perfluorokarbonowych (Jahr et al., 2021)

Zalety emulsji perfluorokarbonowych	Wady emulsji perfluorokarbonowych
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪Możliwość masowej produkcji;</li> <li>▪Niski koszt wytwarzania;</li> <li>▪Długi czas przechowywania;</li> <li>▪Minimalna immunogenność;</li> <li>▪Niskie ryzyko zakażeń.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪Konieczność stosowania emulgatorów, co może powodować działania niepożądane;</li> <li>▪Wymóg stosowania podwyższonego stężenia tlenu w powietrzu wdychanym;</li> <li>▪Ograniczona zdolność do przenoszenia tlenu przy fizjologicznych wartościach ciśnienia parcjalego tlenu (<math>pO_2</math>);</li> <li>▪Ryzyko powiększenia śledziony i wątroby, wystąpienia objawów grypopodobnych oraz małopłytkowości;</li> <li>▪Krótki czas działania w krwiobiegu</li> </ul>

Fluosol-DA był pierwszym zaakceptowanym substytutem erytrocytów opartym na PFC. Stanowił emulsję perfluorodekaliny i perfluorotripropylaminy. Zdolność przenoszenia tlenu przez Fluosol-DA wynosi jedynie 7,2 % w temperaturze 37°C, co jest wartością znacznie niższą niż w przypadku erytrocytów (Nishimura et al., 1981). Użycie tego preparatu wiązało się z występowaniem komplikacji, takich jak reakcje płucne, przypuszczalnie spowodowane aktywacją układu dopełniacza przez emulgator zawarty w Fluosol-DA (Bowma, 1983). Reakcje te można było ograniczyć poprzez podanie sterydów. Z tego powodu skuteczność Fluosol-DA nie została potwierdzona w badaniach klinicznych, a jego stosowanie kliniczne zostało przerwane (Lane, 1995).

Wśród PFC szczegółowo badano perflubron oraz perfluorodekalinę (Nishimura et al., 1981). Do substytutów krwi drugiej generacji opartych na PFC należą OxyFluor™ (Hemagen, Inc.) oraz Oxygent™ (alias perflubron, Alliance Pharmaceutical, Inc.) (Lowe, 2006). Obydwa produkty zostały odrzucone w badaniach klinicznych z powodu skutków ubocznych, takich jak trudności w ustaleniu skutecznej dawki OxyFluor™ oraz zwiększone ryzyko udaru mózgu po podaniu Oxygent™ (Tao and Ghoroghchian, 2014). Mimo to nie odnotowano istotnych interakcji między składnikami krwi a

podanymi preparatami PFC, z wyjątkiem pewnych zmian czynników krzepnięcia (Sharma et al., 2011). Podawanie produktów opartych na PFC może prowadzić do łagodnej trombocytopenii (spadek liczby płytek krwi o 10–15 %) oraz wystąpienia objawów podobnych do zespołu grypopodobnego (Kresie, 2001).

Z powodu niekorzystnych wyników w początkowych badaniach klinicznych nad produktami opartymi na PFC, obecnie nie prowadzi się dalszych badań klinicznych w tej dziedzinie. Niektóre produkty, takie jak Perftoran® (Rosyjska Akademia Nauk, Puszczino, Rosja), są stosowane w Meksyku i Rosji. Perftoran, znany w Stanach Zjednoczonych pod nazwą Vidophor™ (FluorO2 Therapeutics, Inc., Boca Raton, FL), obecnie oczekuje na rozpoczęcie badań klinicznych (Latson, 2019). Ostatecznie, z powodu braku wystarczających dowodów klinicznych oraz długotrwałego procesu uzyskiwania zatwierdzenia przez FDA, PFC prawdopodobnie nie staną się praktycznym substytutem krwi w najbliższej przyszłości (Khan et al., 2020).

### 2. Nośniki tlenu oparte na hemoglobinie (*Hb-based oxygen carriers, HBOCs*)

Obecnie prowadzone są intensywne badania nad znalezieniem syntetycznej substancji,



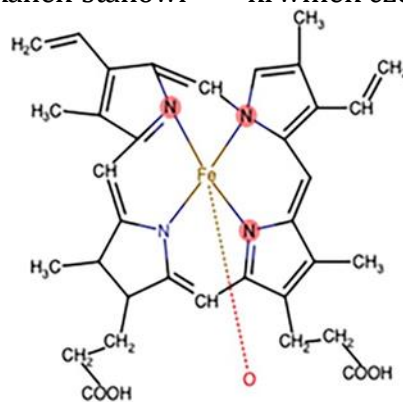
która mogłaby sprostać wyzwaniom związanym z transportem tlenu za pomocą hemoglobiny, efektywnie dostarczając  $O_2$  do tkanek bez wywoływania toksyczności. Niestety, z powodu występowania niekorzystnych zdarzeń w badaniach faz II i III, żaden z dotychczas opracowanych produktów nie uzyskał zatwierdzenia do stosowania klinicznego. Jednak hemoglobinowe nośniki tlenu (HBOC) zostały dopuszczone do użytku klinicznego w Rosji i Republice Południowej Afryki (Lang et al., 1990; Stowell, 2008).

Mimo tych trudności, badania te dostarczyły nowych informacji na temat podstawowych cech biofizycznych hemoglobiny oraz systemów transportu tlenu, otwierając drogę do opracowania produktów o wysokiej zdolności przenoszenia tlenu i minimalnym ryzyku interakcji z hemodynamiką. W tym kontekście produkty oparte na hemoglobinie rozwijane są jako uzupełnienia lub farmaceutyczne środki pomostowe dla transfuzji allogenicznych krwinek czerwonych (Chang, 2003).

Hemoglobina w postaci wolnej może być teoretycznie stosowana jako substytut krwi, ponieważ zachowuje zdolność transportu tlenu poza krwinkami czerwonymi. Jednak jej toksyczność wobec otaczających tkanek stanowi

poważne ograniczenie. Toksyczność obejmuje wychwytywanie tlenku azotu (NO) przez śródbłonek, co prowadzi do wazokonstrykcji (zweżenia naczyń krwionośnych) oraz powstawania reaktywnych rodników tlenowych, hemem i globiną. Ponadto, w przypadku braku 2,3-difosfoglicerynianu (2,3-DPG), wolna hemoglobina jest bardzo nieefektywnym transporterem tlenu, uwalniając jedynie niewielkie ilości  $O_2$  do tkanek (Simoni et al., 2009). Pierwsze zastosowanie hemoglobiny bezkomórkowej u człowieka zostało odnotowane w 1949 roku przez dr. Ambersona i jego zespół, którzy zastosowali roztwór hemoglobiny u pacjentki z masywnym krwotokiem poporodowym (Amberson et al., 1949).

Ze względu na toksyczny charakter wolnej hemoglobiny oraz konieczność obecności 2,3-DPG dla efektywnego transportu tlenu, opracowanie HBOC jest dużym wyzwaniem (ryc. 5). Niemniej jednak, udane stworzenie substytutu krwi opartego na HBOC oferuje wiele korzyści, takich jak brak konieczności testów zgodności przed podaniem, możliwość sterylizacji przez ultrafiltrację lub pasteryzację oraz długi okres przydatności do użycia – cechy, które nie dotyczą tradycyjnych preparatów z krwinek czerwonych od dawców.



Ryc. 5. Struktura nośnika tlenu na bazie hemoglobiny  
(Źródło: Khan et al., 2020)

To jedna z najbardziej zaawansowanych technologii w obszarze sztucznej krwi. HBOC to substytuty krwi bazujące na naturalnej hemoglobinie, które uzyskuje się w procesach polimeryzacji, sieciowania oraz modyfikacji z wykorzystaniem polimerów. Dzięki właściwościom zbliżonym do naturalnej hemoglobiny w zakresie transportu i uwalniania tlenu stanowią one główny przedmiot badań wśród sztucznych nośników tlenu (Zhu et al., 2024).

Źródłem hemoglobiny są przeterminowana, oczyszczona krew ludzka lub bydłęca oraz metody inżynierii genetycznej (Jahr et al.,

2021). Tlen wiąże się z tymi związkami w sposób identyczny jak z naturalnie występującą hemoglobiną. Ze względu na szybki rozpad, możliwość uszkodzenia nerek oraz wysokie powinowactwo do tlenu, utrudniające jego uwalnianie do tkanek, hemoglobina jest modyfikowana. Modyfikacja obejmuje dodatkowe wiązania wewnątrz cząsteczki hemoglobiny, pomiędzy cząsteczkami hemoglobiny lub z substancjami wielkocząsteczkowymi (Sarkar, 2008).

Do stabilizacji hemoglobiny stosuje się różne strategie:

**a) Polimeryzacja hemoglobiny.** Proces ten umożliwia znaczne zwiększenie rozmiaru hemoglobiny pozbawionej komórek, ogranicza wynaczynienie oraz wydłuża czas jej obecności w krążeniu. Polimeryzacja zwykle przeprowadzana jest z użyciem aldehydu glutarowego. Do przykładów produktów opartych na spolimeryzowanej hemoglobinie należą HemAssist, Hemolink, PolyHeme oraz Hemopure (weterynaryjna wersja: Oxyglobin) (Chen et al., 2023).

**b) Sieciowanie hemoglobiny.** Hemoglobinę można usieciować pomiędzy łańcuchami  $\alpha$  lub  $\beta$ , stosując diaspiryne lub rafinozę jako łączniki. Usieciowane tetrametry stabilizują cząsteczkę i zapobiegają dysocjacji oksyhemoglobiny na dimery, które łatwo są wydalane przez nerki. Hemoglobiny, które są usieciowane wewnątrz cząsteczki, mimo że nie wykazują istotnego wzrostu masy cząsteczkowej, charakteryzują się większą trwałością i rozpuszczalnością w roztworach. Teoretycznie produkty te powinny mieć lepszą zdolność transportu tlenu niż naturalne krwinki czerwone (Sarkar, 2008; Chen et al., 2023).

**c) Koniugacja z enzymami przeciwutleniającymi.** Sprzężenie hemoglobiny z enzymami przeciwutleniającymi może chronić cząsteczkę przed uszkodzeniami wywołanymi

przez wolne rodniki. Dodatkowo, koniugacja zwiększa rozmiar cząsteczek, co zmniejsza ich usuwanie przez nerki oraz redukuje ich przechodzenie przez ściany naczyń, ograniczając wychwytywanie tlenu azotu.

Kombinacja powyższych technik, takich jak polimeryzacja z usieciowaniem lub koniugacją, może prowadzić do uzyskania hemoglobiny o lepszych właściwościach funkcjonalnych i biologicznych (Chen et al., 2023). Spośród różnych modyfikacji Hb, jedynie polimerowa hemoglobina (PolyHb) oparta na nanotechnologii oraz hemoglobina sprzężona wykazują skuteczność (Chang, 2006). Niemniej jednak, z powodu krótkiego okresu półtrwania we krwi i działań niepożądanych, większość tych produktów nie spełniła wymagań klinicznych (Tao and Ghoroghchian, 2014). Głównym problemem, który ogranicza zastosowanie tych produktów, jest ich brak zdolności do konwersji  $Fe^{3+}$  do  $Fe^{2+}$ , co jest istotną funkcją krwinek czerwonych. W efekcie tworzy się Met-Hb, który ma ograniczoną zdolność przenoszenia tlenu. Jednakże, wykazano, że takie komplikacje mogą być unikane poprzez przyłączenie odpowiednich reduktorów do powierzchni hemoglobiny w tych produktach (Tao and Ghoroghchian, 2014).

Tabela 2

Zalety i wady roztworów hemoglobiny (Jahr et al., 2021)

Zalety roztworów hemoglobiny	Wady roztworów hemoglobiny
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Duża zdolność wiązania tlenu i dwutlenku węgla;</li> <li>▪ Możliwość stosowania przy fizjologicznych wartościach <math>pO_2</math>;</li> <li>▪ Brak antygenów czerwonych;</li> <li>▪ Przedłużony czas przechowywania;</li> <li>▪ Możliwość sterylizacji i inaktywacji wirusów</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Szybka eliminacja z krwioobiegu;</li> <li>▪ Potencjalna toksyczność dla nerek;</li> <li>▪ Oddziaływanie hipertensyjne na naczynia krwionośne;</li> <li>▪ Możliwość nasilenia działania endotoksyn bakteryjnych</li> </ul>

**Ewolucja substytutów krwi: od pierwszej do trzeciej generacji.** Pierwsza generacja substytutów krwi opierała się na produktach zawierających hemoglobinę pozbawioną błon komórkowych (ang. *stroma-free hemoglobin*, SFH). Produkty te uzyskiwano poprzez lizę zagęszczonych erytrocytów, w wyniku czego powstawała rozpuszczalna hemoglobina. Następnie mieszaninę tę wirowano w celu usunięcia większości składników błony erythrocytarnej, co prowadziło do otrzymania SFH. Procedura ta pozwalała uzyskać 500 ml roztworu hemoglobiny o

stężeniu 7 g/100 ml i fizjologicznym poziomie sodu, potasu oraz wodorowęglanów. Roztwór charakteryzował się pH na poziomie 7,1–7,2 oraz osmolalnością wynoszącą 270–280 mOsm/kg. Stężenie methemoglobiny stanowiło 7–12 % całkowitej zawartości hemoglobiny i nie zmieniało się znacząco w ciągu czterotygodniowego okresu przechowywania w temperaturze 4°C. Produkcja SFH mogła być realizowana za pomocą ultrafiltracji lub krystalizacji (Browdie and Smith, 1975).

SFH uzyskane metodą ultrafiltracji zawierały znacznie mniejsze ilości resztko-

wych fosfolipidów błonowych i bardziej jednorodny skład białkowy. Ponadto, te preparaty były praktycznie pozbawione działania wazokonstrykcyjnego oraz właściwości obniżających kurczliwość mięśnia sercowego w modelach perfuzji *ex vivo*. W przeciwieństwie do tego, SFH uzyskane metodą krystalizacji charakteryzowały się niższym stopniem oczyszczenia z fosfolipidów i białek, co sprzyjało powstawaniu agregatów białkowych w trakcie przechowywania i wywoływało działania niepożądane, takie jak wazokonstrykcja i zmniejszenie kurczliwości, które mogły znacząco różnić się między seriami produkcyjnymi. Badania wskazały, że metoda ultrafiltracji i separacji wielkościowej prowadziła do uzyskania SFH o wyższej jakości w porównaniu do metody krystalizacji (Lang et al., 1990).

Druga generacja HBOC obejmowała koniugaty hemoglobiny pirydoksyloowanej i polioksyetylenu (PHPC). Produkty te powstawały w wyniku chemicznej modyfikacji SFH i zostały zaprojektowane, aby wyeliminować główne wady pierwszej generacji, takie jak zwiększone powinowactwo hemoglobiny do tlenu, krótki czas krążenia w organizmie oraz nefrotoksyczność (Riess, 2006). W procesie produkcji SFH poddawano pirydoksytacji (dodatek witaminy B<sub>6</sub>) w celu regulacji powinowactwa do tlenu, a następnie wiązano z  $\alpha$ -karboksymetyl- $\omega$ -karboksymetoksy polietylenem, co zwiększało masę cząsteczkową i wydłużało czas przebywania we krwi (Chang, 1992).

Do produktów drugiej generacji należały m.in. PolyHeme<sup>®</sup> (Northfield Laboratories), Hemopure<sup>®</sup> (HBOC-201, Hemoglobin Oxygen Therapeutics) oraz HemoLink<sup>™</sup> (Hemosol Inc.). Chociaż wiele z tych produktów wycofano z powodu działań niepożądanych zaobserwowanych w badaniach klinicznych, Hemopure<sup>®</sup> uzyskał zgodę południowoafrykańskiej rady leków na leczenie anemii już w 2001 roku. Produkt ten jest również dostępny w Stanach Zjednoczonych w ramach programu rozszerzonego dostępu FDA (compassionate use) dla pacjentów z zagrażającą życiu anemią, którzy nie akceptują transfuzji krwi (np. Świadkowie Jehowy) (Jahr et al., 2007; Mer et al., 2016).

Trzecia generacja substytutów krwi obejmowała hemoglobinę usieciowaną między łańcuchami  $\alpha$  przy użyciu bis(dibromosalicyl) fumaranów (DBBF) lub  $\alpha\alpha$ -hemoglobinę. Produkty te zostały opracowane w *Letterman*

*Army Institute of Research* (LAIR) w San Francisco oraz przez *Baxter International Corporation*, która stworzyła preparat HemAssist<sup>®</sup> oparty na hemoglobinie usieciowanej aspiryną (*diaspirin-crosslinked hemoglobin*, DCLHB) (Winslow, 1995; Highsmith et al., 1997; Jahr et al., 2007; Vincent et al., 2015). Produkty trzeciej generacji powstawały z przeterminowanej krwi ludzkiej lub wołowej. Krwinki czerwone płucono w sterylnym roztworze soli fizjologicznej, aby usunąć resztki osocza, a następnie poddawano je hiperonicznej lizie. Pozostałości błon komórkowych filtrowano, uzyskując oczyszczoną hemoglobinę, którą poddawano procesowi usieciowania, co pozwalało osiągnąć wydajność na poziomie 55–58% (Nelson et al., 1992; Jahr et al., 2007). Ostateczne produkty wykazywały zdolność do przenoszenia tlenu z właściwościami zbliżonymi do krwi ludzkiej, jednakże w badaniach klinicznych III fazy odnotowano zwiększoną śmiertelność, co ograniczyło ich zastosowanie (Jahr et al., 2007).

Mimo tych ograniczeń, HemoLink<sup>™</sup> wyróżnia się jako nowoczesny produkt oparty na hemoglobinie usieciowanej z aktywowanym cukrem (O-rafinoza). Wykazuje on specyficzne właściwości fizykochemiczne, takie jak ciśnienie P50 na poziomie 30–40 mmHg i brak kooperacyjności w wiązaniu tlenu (współczynnik Hill'a  $n = 1$ ). Produkt ten był testowany w badaniach klinicznych I i II fazy wśród pacjentów poddawanych planowym zabiegom pomostowania tętnic wieńcowych (CABG), jednak brak dostępnych danych z badań III fazy ogranicza jego dalsze zastosowanie (Carmichael et al., 2000; Hill et al., 2002; Boykins et al., 2005).

Nośniki tlenu na bazie Hb (HBOC) dzielą się na dwie grupy: HBOC bezkomórkowe i HBOC komórkowe (ryc. 6 i 7). Opracowano bezkomórkowe HBOC w celu zwiększenia wydajności Hb i zmniejszenia jej skutków ubocznych (Moradi et al., 2016). Obecnie znajdują się one w różnych fazach badań klinicznych i należą do trzech kategorii, w tym usieciowanego HBOC, polimeryzowanego HBOC i sprzężonego HBOC (ryc. 6). Jednak spośród różnych modyfikacji Hb skuteczne są jedynie polihemoglobina (PolyHb) oparta na nanotechnologii i sprzężona Hb (Chang, 2006). Jednak ze względu na krótki okres półtrwania we krwi i skutki uboczne większość tych produktów nie osiągnęła wymaganych kryteriów w badaniach klinicznych (Tao and Ghoroghchian, 2014).



Ryc. 6. Bezkomórkowe nośniki tlenu na bazie hemoglobiny (Moradi et al., 2016)

Inne rodzaje produktów opartych na hemoglobinie, stosowanych jako sztuczna krew, to komórkowe nośniki tlenu, w których hemoglobina jest zamknięta w strukturze przypominającej komórkę. W ten sposób powstały produkty o najwyższym podobieństwie

do krwinek czerwonych, które nie powodują aktywacji naczyniowej z powodu wychwytywania tlenu azotu (NO). Podsumowanie produktów odpowiadających komórkowym produktom opartym na hemoglobinie przedstawiono na ryc. 7.



Ryc. 7. Komórkowe nośniki tlenu na bazie hemoglobiny (Moradi et al., 2016)

**Hb rekombinowana.** Najwyższą aktywność hemoglobina wykazuje, gdy znajduje się w erytrocytach. Dlatego też, jeśli Hb ma być stosowana w formie wolnej od komórek, konieczne jest jej poddanie licznym modyfikacjom w celu zwiększenia czasu półtrwania w krążeniu oraz zapobiegania związanym z tym powikłaniom w organizmie.

Rekombinowana produkcja hemoglobiny ułatwia wprowadzanie modyfikacji, szczególnie za pomocą mutagenyzy ukierunkowanej na określone miejsca (Fronticelli and Koehler, 2009).

W latach 80. XX wieku rozpoczęto masową produkcję ludzkiej hemoglobiny w organizmach transgenicznym. Od tego czasu

prowadzone są badania mające na celu poprawę jakości oraz efektywności produkcji rekombinowanej hemoglobiny. Należy podkreślić, że większość badań koncentruje się na wytwarzaniu hemoglobiny za pomocą systemu ekspresji w *E. coli* (Hoffman et al., 1990; Varnado et al., 2013). Jednak hemoglobinę wyrażano również w innych systemach bakteryjnych, a także w transgenicznym myszach i świniami (Varnado et al., 2013). Niemniej jednak najważniejszymi problemami w rekombinowanej produkcji hemoglobiny są niskie wydajności ekspresji, wysokie koszty procesów produkcyjnych oraz trudności w uzyskaniu oczekiwanej czystości produktu (Varnado et al., 2013).

Podjęto wiele prób zwiększenia wydajności produkcji rekombinowanej hemoglobiny. Na przykład, w jednym z badań zastosowano system ekspresji w *E. coli* do produkcji dużych ilości ludzkiej  $\alpha$ -globiny oraz bydlęcej  $\beta$ -globiny do celów terapeutycznych (Hoffman et al., 1990). Następnie powstałe hemoglobiny (Hb Minotaur) polimeryzowano za pomocą międzycząsteczkowych wiązań dwusiarczkowych, tworząc Hb Polytaur. Badania na zwierzętach wykazały pewne przewagi tego produktu nad innymi tego rodzaju (Bobofchak et al., 2003).

Zaproponowano także, że mutacje łańcuchów hemoglobiny ( $\beta$ Gly16  $\rightarrow$  Ala i  $\alpha$ Gly15  $\rightarrow$  Ala) mogą zwiększyć wydajność jej produkcji poprzez zapobieganie degradacji i agregacji wyrażanych łańcuchów. Ponadto, w celu zwiększenia wydajności produkcji hemu niezbędnego do wytwarzania funkcjonalnej hemoglobiny, można zastosować strategię jednoczesnej ekspresji transportera hemu w błonie bakteryjnej. Taka metoda może zwiększyć wychwyt hemu przez gospodarza bakteryjnego, a tym samym poprawić wydajność produkcji hemoglobiny (Graves et al., 2008).

Ukierunkowane mutacje hemoglobiny mogą także prowadzić do poprawy jej funkcji poza erytrocytami. Przykładowo, mogą one zwiększyć powinowactwo do tlenu, zmniejszyć zdolność hemoglobiny do wiązania NO, ograniczyć autoutlenianie, zmniejszyć tempo utraty hemu, zapobiec dysocjacji podjednostek oraz ograniczyć nieodwracalną denaturację podjednostek (Varnado et al., 2013).

W innym badaniu wyprodukowano rHb ( $\beta$ N108Q) przy użyciu systemu ekspresji w *E. coli*. W tej wersji hemoglobiny mutacja N  $\rightarrow$  Q wystąpiła w pozycji 108 łańcucha  $\beta$ , która

znajduje się w interfejsie podjednostek  $\alpha\beta$ 1 oraz w centralnej jamie hemoglobiny. Mutacja ta powoduje zmniejszenie powinowactwa do tlenu, zwiększenie kooperatywności oraz obniżenie autoutleniania produktu (Hoffman et al., 1990; Tsai et al., 2000).

Są to jedynie niektóre przykłady udanych prób produkcji rekombinowanych HBOC, które mogą być wykorzystywane jako potencjalne substytuty krwi. Żaden z tych produktów nie uzyskał jednak licencji terapeutycznej (Varnado et al., 2013).

Przykłady preparatów zawierających zmodyfikowaną hemoglobinę (Moradi et al., 2016; Khan et al., 2020):

- PHP (Apex Bioscience) – ludzka;
- HemAssist (Baxter) – ludzka;
- Hemopure (Biopure) – zwierzęca (bydlęca);
- PEG-hemoglobin (Enzon) – zwierzęca (bydlęca);
- Hemolink (Hemosol) – ludzka;
- PolyHeme (OPK Biotech) – ludzka;
- Optro-rHb-1 (Baxter) – rekombinowana;
- No red cells (Terumo) – ludzka;
- Hemospan (Sangart) – ludzka.

### 3. Sztuczne krwinki czerwone

Nośniki tlenu oparte na hemoglobinie stanowią obecnie obiekt intensywnych badań, ze względu na swoje unikalne właściwości, które są zbliżone do funkcji naturalnych krwinek czerwonych. Hemoglobina pochodząca od ludzi lub zwierząt może zostać zamknięta w dwuwarstwowych kapsułkach fosfolipidowych, które naśladują błonę komórkową erytrocytów. Dodanie cząsteczek cholesterolu do struktury fosfolipidowej zapewnia większą sztywność i stabilność mechaniczną hemoglobiny umieszczonej w liposomach (Moradi et al., 2016).

Proces ten polega na zamknięciu cząsteczek hemoglobiny w liposomach, co określa się także mianem pęcherzyków hemoglobiny (HbV). Mikrokapsułki lipidowe lub wykonane z biodegradowalnych polimerów, które można uzyskać dzięki organicznej koniugacji nanomateriałów z hemoglobiną, odzwierciedlają strukturę naturalnych erytrocytów, jednocześnie przynosząc dodatkowe korzyści, takie jak redukcja aktywności naczyń oraz poprawa bezpieczeństwa biologicznego (Sakai et al., 2009).

Enkapsulacja hemoglobiny w warstwie fosfolipidowej (liposomowo-enkapsulowana hemoglobina (LEH)) wydłużyła czas półtrwania i okres przechowywania w porównaniu do produktów bezkomórkowych. Częsteczki LEH są znacznie mniejsze od erytrocytów (1:30), co umożliwia im przenikanie do obszarów ciała, do których erytrocyty nie mają dostępu. W związku z tym mogą one przechodzić przez skrzepy i blokady, co prowadzi do poprawy oksygenacji w przypadku udaru (Sharma et al., 2011). Jednakże produkt ten charakteryzuje się krótkim czasem półtrwania w krążeniu, co można poprawić, na przykład, poprzez PEGylację powierzchni cząsteczek (Sharma et al., 2011).

W jednym z badań opracowano liposomowo-enkapsulowane hemoglobiny, określane mianem „neo-erytrocytów,” których skuteczność jako sztucznych erytrocytów została potwierdzona w badaniach nad całkowitym krążeniem pozaustrojowym u zwierząt. Wyniki wskazały, że te produkty mogą dostarczać nawet więcej tlenu niż naturalne erytrocyty (Usuba et al., 1995).

Modyfikacja powierzchni tych liposomów, w tym PEGylacja, prowadzi do produktów o wydłużonym czasie półtrwania, większej stabilności i rozpuszczalności, a także o zmniejszonej antygenowości i immunogenności. „Hb vesicle” to PEGylowany produkt charakteryzujący się długim czasem półtrwania w surowicy oraz zmniejszoną rozpoznawalnością przez układ odpornościowy (Sakai et al., 2001; Sou et al., 2005).

Krótkotrwałość LEH w surowicy wynika nie tylko z ich eliminacji przez układ siateczkowo-śródbłonkowy, ale również z niszczenia liposomów spowodowanego siłami ścinania w krwiobiegu. Aby rozwiązać ten problem, do wodnego rdzenia submikronowych liposomów wprowadzono matrycę aktywną, co zwiększyło ich wytrzymałość mechaniczną. Ta strategia przyczyniła się do wydłużenia czasu półtrwania produktu, znanego jako LEAcHb (Li et al., 2005).

Kolejną grupą produktów, które pełnią funkcję imitatorów erytrocytów, są biodegradowalne polimerowe nanocząstki załadowane hemoglobina (HbPNP). Największym problemem związanym z ich zastosowaniem jest szybkie usuwanie przez fagocyty, bezpośrednio lub za pośrednictwem opsonin. W celu rozwiązania tego problemu przeprowadzono szereg badań, w tym eksperyment, który wykazał, że zmiana ładunku powierzchniowego

poprzez kationizowany bromek cetylotrimetyloamoniowy zwiększa czas półtrwania PEGylowanych HbPNP. Zauważono, że ładunek powierzchniowy ma istotny wpływ na czas krążenia tych produktów – anionizowane HbPNP są szybko usuwane z krwiobiegu, podczas gdy kationizowane HbPNP mają długi czas półtrwania (Xu et al., 2009).

Innym rozwiązaniem, które oferuje biokompatybilność, są dendrymery – produkty o rozgałęzionej strukturze molekularnej. Wśród syntetycznych dendrymerów znajdują się polipropylen, poli(aminokwas amonowy) oraz poliester (Scott et al., 2005). W niektórych badaniach przygotowano dendrymery z porfiryną i Fe(II), które miały naśladować funkcję hemoglobiny. Kształt i rozmiar tych produktów przypominają hemoglobinę, a ich zdolność do wiązania i uwalniania tlenu została udowodniona. Produkcja dendrymerów jest jednak czasochłonna i kosztowna. Z tego powodu opracowano nowy typ dendrymerów, tzw. hiperrozgałęzione polimery, które po odpowiednich modyfikacjach mogą być stosowane jako nośniki tlenu, przy jednoczesnym zmniejszeniu trudności związanych z produkcją (Twyman and Ge, 2006; Twyman et al., 2012). Dendrymery są także wykorzystywane w enkapsulacji leków, co sugeruje ich potencjalne zastosowanie jako sztuczne nośniki tlenu przez enkapsulację hemoglobiny (Astruc et al., 2010).

Jako substytut erytrocytów oparty na hemoglobinie badano również nanokapsułki z membraną zbudowaną z ultracienkiego polietylenu glikolu–kwasu polimlekowego (PEG–PLA), zawierające spolimeryzowaną hemoglobinę oraz wszystkie enzymy erytrocytów (Chang et al., 2003). W porównaniu do wcześniejszego produktu, w którym zastosowano jedynie membrany PLA, ta metoda wykazała znaczący wzrost czasu półtrwania produktu dzięki redukcji fagocytozy, co potwierdzono w badaniach na myszach (Chang et al., 2003; Sheng et al., 2009). Wysoki czas krążenia oraz obecność systemów enzymatycznych, w tym reduktazy, stanowią najważniejsze zalety tego systemu. Obecność układu enzymatycznego, zwłaszcza reduktazy, zapobiega akumulacji methemoglobiny (Chang et al., 2003).

Nowa klasa materiałów do enkapsulacji hemoglobiny obejmuje lipogele oraz NHP (nanocząstki hydrożelowe). W przypadku NHP stosuje się niebiodegradowalne, ale biokompa-

tybilne polimery hydrofilowe, które zamykają hemoglobinę w solidnych, sferycznych nanocząstkach hydrożelowych. Liczne komplikacje związane z uwalnianiem hemoglobiny po degradacji biodegradowalnych polimerów przyczyniły się do wzrostu zainteresowania zastosowaniem polimerów niebiodegradowalnych. Lipogeje to NHP zamknięte w dwuwarstwie lipidowej, stanowiące połączenie hydrożelu i liposomu. Tworzone są poprzez fotopolimeryzację monomerów poli(N-izopropylakrylamidu) i poliakrylamidu. Podejście to wzmacnia wytrzymałość mechaniczną systemu liposomalnego. W rzeczywistości produkt ten łączy zalety hydrożelu i liposomu, charakteryzując się wysoką zdolnością załadowania hemoglobiny i niską podatnością na rozpoznawanie przez układ siateczkowo-śródbłonkowy (Patton and Palmer, 2005).

Zwiększoną zdolność załadowania hemoglobiny, nawet wyższą niż w przypadku lipogeli i NHP, wykazano w polimerosomach enkapsulujących hemoglobinę (PEH). Produkt ten składa się z biodegradowalnych, biokompatybilnych kopolimerów amfifilowych diblokowych i jest wykorzystywany do zamykania hemoglobiny ludzkiej lub zwierzęcej. PEH można łatwo produkować w dużych ilościach, a ich powinowactwo do tlenu jest porównywalne do erytrocytów ludzkich. Wytrzymałość mechaniczna oraz możliwość zmiany rozmiaru i grubości są wyższe w przypadku PEH niż w liposomach, a produkty te są w stanie wytrzymać temperatury do 60°C. Są stabilne w roztworze soli fizjologicznej przez kilka miesięcy oraz w krwi przez co najmniej pięć dni. Zgodnie z narastającymi dowodami, produkty te mogą zapowiadać pojawienie się idealnego sztucznego nośnika tlenu (Arifin and Palmer, 2005; Rameez et al., 2008). W przypadku nanokapsułek pojedynczego białka cząsteczka białka jest zamykana w cienkiej warstwie polimerowej, a wynikowy produkt wykazuje odporność mechaniczną, termiczną oraz zmiany pH. Metoda ta została zastosowana również do hemoglobiny (Hegedüs et al., 2014).

Jeszcze jeden nośnik tlenu został opracowany przez grupę badawczą, w którym hemoglobina została sprzężona z biodegradowalnymi polimerowymi micelami (Shi et al., 2009). Micela jest tryblokowym kopolimerem

PEG-PMPC-PLA, w którym PEG pełni rolę zewnętrznej otoczki, PMPC (PLA-b-poli(2-metakryloilooksyetylofosforylocholina)) zawiera grupy propargilowe jako warstwę środkową, a PLA jest warstwą rdzeniową. Po wyprodukowaniu tych miceli w roztworze wodnym grupy Hb wiążą się z micelami za pośrednictwem grup propargilowych, co sprawia, że Hb jest otoczona i chroniona przez łańcuchy PEG (Shi et al., 2009).

Dynamiczny rozwój nanotechnologii i nanomateriałów stworzył nowe możliwości w badaniach nad nośnikami tlenu na bazie hemoglobiny. Nano-HBOC, czyli nośniki hemoglobiny opracowane z wykorzystaniem nanotechnologii, cechują się ulepszoną stabilnością strukturalną, zmniejszoną wazoaktywnością, wydłużonym okresem półtrwania oraz poprawioną biokompatybilnością. Jednakże, mimo intensywnego postępu, Nano-HBOC napotyka na istotne ograniczenia: wymagają skomplikowanych procesów produkcyjnych oraz wysokich nakładów finansowych. Dlatego opracowanie prostszych, bezpieczniejszych i bardziej opłacalnych metod wytwarzania Nano-HBOC pozostaje jednym z głównych kierunków badań (Zhu et al., 2024).

Odtworzenie funkcji i właściwości naturalnych krwinek czerwonych w konstrukcji Nano-HBOC stanowi ogromne wyzwanie technologiczne. Obecnie większość tych rozwiązań znajduje się na etapie badań laboratoryjnych, nie osiągając jeszcze fazy badań klinicznych. Kompleksowa ocena potencjału Nano-HBOC jako substytutów erytrocytów jest zatem niezbędna. Rozwój tego rodzaju technologii może mieć ogromne znaczenie dla postępu w medycynie, oferując rewolucyjne podejście do leczenia pacjentów wymagających transfuzji krwi, a tym samym istotnie poprawiając jakość życia (Zhu et al., 2024).

Wprowadzenie nanocząstek zawierających hemoglobinę przyczyniło się do eliminacji wielu negatywnych skutków ubocznych, takich jak toksyczność związana z obecnością wolnej hemoglobiny, a także zwiększyło zdolność przenoszenia tlenu i efektywność działania dzięki możliwości umieszczenia większej ilości hemoglobiny w kapsułkach (Jahr et al., 2021).

Zalety i wady sztucznych krwinek czerwonych zostały przedstawione w Tabeli 3.

## Zalety i wady sztucznych krwinek czerwonych (Jahr et al., 2021)

Zalety sztucznych krwinek czerwonych	Wady sztucznych krwinek czerwonych
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Dłuższy czas pozostawania w krążeniu w porównaniu do preparatów perfluorokarbonowych i niektórych roztworów hemoglobiny;</li> <li>▪ Brak toksyczności związanej z obecnością wolnej hemoglobiny w osoczu;</li> <li>▪ Możliwość modyfikacji funkcji hemoglobiny w mikrokapsułkach poprzez dołączenie wybranych enzymów erytrocytarnych;</li> <li>▪ Możliwość jednoczesnego transportu substancji leczniczych w mikrokapsułkach z hemoglobina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Niedostateczna liczba danych dotyczących powikłań, takich jak aktywacja układu dopełniacza czy eliminacja mikrokapsulek przez układ siateczkowo-śródbłonkowy;</li> <li>▪ Brak wejścia na etap badań klinicznych;</li> <li>▪ Wysoka złożoność technologiczna, która wydłuża czas potrzebny na opracowanie finalnych produktów</li> </ul>

**Postępy i wyzwania w rozwoju sztucznej krwi.** Od ponad stu lat trwają intensywne badania nad opracowaniem sztucznej krwi, której potencjalne zastosowanie mogłoby przynieść korzyści w medycynie klinicznej. Mimo znacznego postępu w dziedzinie nauk medycznych i technologii, jak dotąd nie udało się stworzyć uniwersalnego i w pełni akceptowanego substytutu krwi ludzkiej (Khan et al., 2020). Poniżej przedstawiono niektóre z produktów, które są aktualnie przedmiotem badań klinicznych:

1. **HemAssist.** Jest to pierwszy nowoczesny nośnik tlenu opracowany przez firmę Baxter (USA) we współpracy z amerykańską armią. Produkt stanowił tetrameryczną hemoglobinę, w której dwie podjednostki  $\alpha$  ( $\alpha$ - $\alpha$ ) zostały usieciowane za pomocą 2,3-diaspiryny, pozyskiwanej z przeterminowanej ludzkiej krwi (Sloan et al., 1999). HemAssist był dobrze tolerowany przez pacjentów w badaniach klinicznych fazy I i II. Ponadto, w badaniach fazy III wykazano jego działanie oszczędzające krew. Jednakże u pacjentów chirurgicznych uczestniczących w tej fazie zaobserwowano zwiększone ryzyko zapalenia trzustki oraz zawału mięśnia sercowego. W badaniach fazy III wśród pacjentów urazowych przeprowadzonych w Stanach Zjednoczonych stwierdzono wyższą śmiertelność w grupie leczonej w porównaniu do grupy kontrolnej, choć w badaniach europejskich tej samej fazy śmiertelność rozkładała się bardziej równomiernie między grupami. Program badawczy HemAssist został zakończony w 1999 roku (Sloan et al., 1999; Chen et al., 2023).

2. **PolyHem.** PolyHeme to produkt opracowany przez Northfield Laboratories (Evanston, IL, USA) po zakończeniu wojny w

Wietnamie, wykorzystujący przeterminowaną ludzką krew jako surowiec. PolyHeme przeszedł wszystkie etapy badań klinicznych – fazy I, II i III. Produkt skutecznie podnosił poziom hemoglobiny w osoczu u pacjentów, którzy zamiast przetoczenia allogenicznej krwi ludzkiej otrzymywali PolyHeme. Niemniej jednak, w badaniach klinicznych fazy III, PolyHeme nie spełnił kryteriów w odniesieniu do 30-dniowej śmiertelności. W maju 2009 roku FDA odrzuciła wniosek o udzielenie licencji biologicznej na dopuszczenie produktu do obrotu. W wyniku tego Northfield Laboratories ogłosiło upadłość, co zakończyło drogę tego produktu do zastosowania klinicznego (Chen et al., 2023).

3. **HemoLink.** HemoLink został opracowany przez firmę Hemosol Inc. (Mississauga, Kanada) jako unikalny roztwór hemoglobiny zawierający stabilizowane tetrameryczne jednostki hemoglobiny A, które zostały usieciowane przy użyciu polialdehydowych polimerów o-rafinozy (Prempeh and Cheng, 2022). Produkt wykazywał obiecujące wyniki w badaniach klinicznych fazy III, ratując życie niektórym pacjentom. Niemniej jednak, HemoLink nie uzyskał pozwolenia na dopuszczenie do obrotu w Kanadzie. W 2003 roku Hemosol wstrzymał badania kliniczne, a w 2005 roku ogłosił upadłość (Jahr et al., 2021).

4. **Hemopure (Hb-201, Oxyglobin).** Hemopure został opracowany przez korporację Biopure (Cambridge, MA, USA) jako chemicznie stabilizowana, usieciowana hemoglobina bydlęca rozpuszczona w roztworze soli, przeznaczona do zastosowania u ludzi. Firma Biopure opracowała także analogiczny produkt pod nazwą Oxyglobin, zatwierdzony do stosowania weterynaryjnego u psów w USA w 1997 roku, a w Europie w 1998 roku. Hemopure uzyskał



aprobate w Republice Południowej Afryki w 2001 roku oraz w Rosji w 2006 roku (Waters et al., 2022). Dodatkowo produkt uzyskał w USA zgodę FDA na zastosowanie rozszerzone.

Hemopure był oceniany w badaniach klinicznych w kardiologii, gdzie wykazano wzrost natlenienia i perfuzji wieńcowej. Produkt wyróżnia się zdolnością do dostarczania tlenu do tkanek niedokrwionych bez potrzeby pulsacyjnego przepływu krwi, co jest możliwe dzięki małej wielkości polimeru i wyjątkowej zdolności do wiązania tlenu w płucach oraz jego uwalniania na poziomie tkankowym. Hemopure wydawał się bezpieczny u pacjentów poniżej 80. roku życia, którzy nie cierpieli na ciężkie choroby współistniejące.

Niestety, firma Biopure Corporation nie uzyskała pełnej aprobaty FDA na stosowanie kliniczne produktu, co doprowadziło do ogłoszenia ochrony przed bankructwem w 2009 roku. W tym samym roku firma sprzedała swoje aktywa OPK BioTech (Cambridge, MA, USA), a w 2014 roku produkt został przejęty przez Hemoglobin-O<sub>2</sub> Therapeutics (Souderton, PA, USA). Nowy właściciel kontynuował rozwój Hemopure.

Jedno z niedawnych badań sponsorowanych przez Hemoglobin-O<sub>2</sub> Therapeutics wykazało, że Hemopure może potencjalnie przywracać krążenie mózgowe oraz funkcje komórkowe do czterech godzin po śmierci w modelach zwierzęcych. Wyniki opublikowane w kwietniowym numerze czasopisma Nature w 2019 roku pokazały znaczące zmniejszenie śmierci komórek oraz przywrócenie niektórych funkcji komórek mózgowych, w tym spontanicznej aktywności synaptycznej. Hemopure był kluczowym składnikiem w procesie dostarczania tlenu do mózgu. Dalsze badania nad dynamiką regeneracji komórek po przedłużonym globalnym niedokrwieniu potwierdziły wstępne dane przedkliniczne i kliniczne, które wykazały zdolność Hemopure do perfuzji narządów, takich jak nerki i wątroba. Sugeruje to, że Hemopure może potencjalnie zastąpić koncentraty krwinek czerwonych w transplantologii narządów (Waters et al., 2022; Chen et al., 2023).

**5. HemO<sub>2</sub>life.** HemO<sub>2</sub>life został opracowany przez firmę Hemarina we Francji jako produkt oparty na naturalnej hemoglobinie zewnątrzkomórkowej wyizolowanej z pierścienicy morskiej *Arenicola marina*. Unikalne cechy tego produktu czynią go potencjalnym nowym środkiem terapeutycznym, zapewniającym natlenienie tkanek w różnych sytuacjach

klinicznych (Zal et al., 2022). HemO<sub>2</sub>life jest także stosowany do konserwacji narządów dawcy przed transplantacją, wspierając ich funkcjonowanie w warunkach przedklinicznych i klinicznych, co zostało zatwierdzone w Unii Europejskiej. Produkt okazał się bezpieczny jako dodatek do roztworów konserwujących narządy, a także ma korzystny wpływ na urazy niedokrwienno-reperfuzyjne. Posiada liczne potencjalne zalety w praktyce klinicznej i innych zastosowaniach (Zal et al., 2022).

Pierścienica morska *Arenicola marina* to gatunek bardzo stary, który istnieje na Ziemi od 450 milionów lat i kolonizuje obszary międzybrzegowe wschodniego wybrzeża Atlantyku, od Morza Północnego po Biarritz. HemO<sub>2</sub>life posiada kilka unikalnych właściwości:

- naturalna hemoglobina zewnątrzkomórkowa, spolimeryzowana o masie cząsteczkowej około 50 razy większej niż hemoglobina ludzka,
- funkcjonalne właściwości wiązania i uwalniania tlenu podobne do hemoglobiny ludzkiej,
- zdolność do wiązania 156 cząsteczek tlenu w porównaniu do 4 w przypadku hemoglobiny ludzkiej,
- naturalne właściwości antyoksydacyjne dzięki wrodzonej aktywności podobnej do dysmutazy ponadtlenkowej.

W przyszłości istnieje nadzieja, że HemO<sub>2</sub>life uzyska aprobatę do leczenia niedokrwistości w Unii Europejskiej oraz innych krajach. Produkt ten był także testowany u pacjentów z COVID-19 i wykazano, że może zwiększać zawartość tlenu w tętnicach w sytuacji, gdy wymiana gazowa w płucach była niewystarczająca, ponieważ wiązanie i uwalnianie tlenu zachodziło biernie w prostym gradiencie tlenu. HemO<sub>2</sub>life mogło poprawiać przeżywalność pacjentów z COVID-19, minimalizując konieczność intubacji dotchawiczej, skracając czas suplementacji tlenowej i umożliwiając leczenie wielu pacjentów w warunkach niedoboru respiratorów (Lupon et al., 2021).

**6. Pęcherzyki hemoglobinowe (HbV).** Pęcherzyki hemoglobinowe (ang. *Hemoglobin vesicles*, HbV) to strukturalne nośniki hemoglobiny o konfiguracji komórkowej, zawierające oczyszczony i skoncentrowany roztwór hemoglobiny zamknięty w pegylowanych pęcherzykach fosfolipidowych. HbV mają konfigurację liposomów, a ich średnica cząsteczek wynosi od 225 do 285 nm, co pozwala na neutralizację potencjalnie toksycznych efektów działania

cząsteczek hemoglobiny dzięki sztucznej dwuwarstwie lipidowej, imitującej błonę komórkową erytrocytów (Sakai et al., 2022).

Pęcherzyki hemoglobinowe zostały szeroko opisane jako płyn resuscytacyjny w modelach zwierzęcych, a także w badaniach dotyczących farmakokinetyki, biodystrybucji, wydalania, odpowiedzi immunologicznej oraz hematologii. Pierwsze badanie kliniczne fazy I na ludziach, przeprowadzone w latach 2020–2021, miało na celu ocenę bezpieczeństwa i farmakokinetyki HbV. Wyniki wykazały, że produkt ten jest bezpieczny i skuteczny. HbV mogą potencjalnie znaleźć zastosowanie jako alternatywa dla transfuzji krwi allogenicznej, a także w terapii tlenowej i tlenkiem węgla, jako perfuzat do organów przeznaczonych do transplantacji oraz jako fotosensybilizator (Frost et al., 2018; Sakai et al., 2022). Grupa dr. Sakaiego w Japonii uzyskała również zezwolenie na przeprowadzenie badania klinicznego fazy I (Sakai et al., 2022).

7. **Optro.** Optro zostało opracowane przez Somatogen Inc. w San Diego (Kalifornia, USA) oraz Eli Lilly w Indianapolis (Indiana, USA). Jest to genetycznie modyfikowana, rekombinowana hemoglobina, usieciowana glicyną. Optro to produkt uzyskiwany dzięki technologii rekombinowanego DNA, w której zmodyfikowane geny ludzkiej hemoglobiny były eksprymowane w komórkach, takich jak *Escherichia coli* i drożdże (Jahr et al., 2021; Burhop, 2022).

Niektóre sekwencje aminokwasowe naturalnych genów ludzkiej hemoglobiny zostały zmodyfikowane w celu zminimalizowania dysocjacji cząsteczek hemoglobiny na dimery w krwiobiegu oraz zachowania ich powinowactwa do tlenu podczas stosowania technologii rekombinowanego DNA. Geny hemoglobiny wprowadzano do komórek *E. coli* za pomocą wektora plazmidowego, a ekspresja tych genów indukowała produkcję białka hemoglobiny wewnątrz komórek *E. coli*. Technika ta nie jest tania, a wysoki koszt produkcji stanowi jedno z głównych wyzwań dla masowej produkcji hemoglobiny. Optro było pierwszym produktem w tej kategorii (Burhop, 2022).

Przyszłe badania będą ukierunkowane na wybór różnych kombinacji wielu mutacji, które ograniczyłyby wychwytywanie tlenu azotu, degradację oksydacyjną i denaturację, nie wpływając negatywnie na dostarczanie tlenu (Burhop, 2022). Okres półtrwania Optro wynosił od 2 do 19 godzin. Chociaż produkt był względnie dobrze tolerowany przez pacjentów, nie spełnił kryteriów FDA i został wycofany w

1999 roku z powodu wychwytywania tlenu azotu.

8. **Hemospan.** Hemospan, opracowany przez Sangart Inc. w San Diego (Kalifornia, USA), to hemoglobina ludzka sprzężona z glikolem polietylenowym (PEG), charakteryzująca się zwiększonym rozmiarem cząsteczek i poprawionymi właściwościami powinowactwa do tlenu. Wstępne badania kliniczne przyniosły obiecujące wyniki, a Hemospan nie powodował poważnego skurczu naczyń, jak inne produkty z grupy HBOC. Jest to wynikiem sprzężenia hemoglobiny z rozpuszczalnym polimerem PEG. Dzięki wysokiemu poziomowi uwodnienia roztworów PEG, cząsteczki hemoglobiny mają większy promień cząsteczkowy, co uniemożliwia im przechodzenie przez połączenia międzykomórkowe. Hemospan ma więc mniejszy wpływ na wychwytywanie tlenu azotu oraz powoduje mniejsze skurcze naczyń i nadciśnienie.

Mimo obiecujących wyników, Hemospan nie spełnił wymagań klinicznych w III fazie badań jako substytut krwi i został wycofany w 2015 roku (Smani, 2008). W badaniach fazy I i II był dobrze tolerowany przez ochotników i pacjentów, nie powodując poważnych działań niepożądanych, takich jak nadciśnienie czy zaburzenia żołądkowo-jelitowe. Dwa badania III fazy, przeprowadzone w Europie i USA, porównywały Hemospan z Voluvenem pod kątem efektywności w wypełnianiu objętości wewnątrzoperacyjnej oraz prewencji hipotensji. Wyniki tych badań nie spełniły oczekiwań, a uważa się, że projekt badań klinicznych nie był odpowiednio zaplanowany. Hemospan nie został opracowany głównie jako środek wypełniający objętość, lecz jako terapeutyczny środek tlenowy (Smani, 2008).

9. **Sanguitate.** Sanguitate, opracowane przez Prolong Inc. w South Plainfield (New Jersey, USA), to unikalna forma hemoglobiny bydłowej zmodyfikowanej PEG. Reprezentuje najnowszą generację nośników tlenu opartych na hemoglobinie. PEGylacja hemoglobiny w warunkach tlenowych znacząco zmienia jej właściwości strukturalne i funkcjonalne, aktywując dysocjację tetrameru, zwiększając powinowactwo do tlenu i eliminując kooperatywność wiązania tlenu (Romito et al., 2022). PEGylacja w warunkach beztlenowych prowadzi do powstania HBOC o niskim powinowactwie do tlenu, które zachowuje kooperatywność wiązania tlenu, nie powoduje nadciśnienia w modelu zwierzęcym i w 99% pozostaje w osoczu przez 6 godzin. W

sytuacjach, w których w tkankach występują bardzo niskie napięcia tlenu, HBOC o wysokim powinowactwie może optymalizować jego dostarczanie (Romito et al., 2022).

Strukturalne cechy Sanguinate i zmienne powinowactwo hemoglobiny do tlenu pozwalają omijać przeszkody w mikrokrążeniu, skutecznie dostarczając tlen do niedokrwionych tkanek (Cooper et al., 2021). Sanguinate ma także zdolność do endogennego dostarczania tlenku węgla, który zmniejsza stan zapalny, łagodzi uszkodzenia związane z reperfuzyją niedokrwioną oraz aktywuje rozszerzenie naczyń krwionośnych.

Chociaż opublikowano tylko wyniki badań fazy I, zakończono także kilka badań fazy II, które sugerowały możliwe ryzyko uszkodzenia mięśnia sercowego, choć nie wskazywały jednoznacznie na to, że było to spowodowane przez Sanguinate. Konieczne są większe badania, aby dokładniej zbadać ten związek przyczynowy. Sanguinate zostało użyte w sytuacjach awaryjnych u ponad 100 pacjentów z ciężką anemią, gdzie transfuzja krwi była przeciwwskazana. Dodatkowe efekty terapeutyczne, takie jak przeciwzapalne, przeciwskurczowe i zwiększające objętość osocza, mogą sprawić, że Sanguinate będzie użyteczne w leczeniu zaburzeń, w których krew jest nieskuteczna, takich jak udar, choroby zapalne czy posocznica. Z tego względu Sanguinate jest bardziej określane jako płyn resuscytacyjny (Cooper et al., 2021).

10. **HemoxiMer.** HemoxiMer, opracowany przez Apex Bioscience w Karolinie Północnej (USA), to chemicznie zmodyfikowana ludzka hemoglobina, będąca koniugatem hemoglobiny pirodyksalowanej i poliolefiny etylenowej (PHP). Z tego powodu HemoxiMer bywa określany jako PHP/HemoxiMer. Początkowo opracowywano go jako preparat do terapii tlenowej opartej na hemoglobinie, jednak później skoncentrowano się na jego zastosowaniu jako pochłaniacza tlenku azotu w stanach patologicznych charakteryzujących się wysokim poziomem tego gazu (Priavalle and De Angelo, 2022).

HemoxiMer przeszedł badania kliniczne fazy I i II, a dwa badania fazy III (jedno w USA, drugie w UE) zostały częściowo ukończone. Niestety, z powodu niepowodzenia w fazie III rozwój HemoxiMeru został wstrzymany. Mimo to badania kliniczne wykazały, że HemoxiMer wykazuje aktywność jako pochłaniacz tlenku azotu (Wollocko et al., 2022).

11. **OxyVita.** OxyVita to nowej generacji polimerowy HBOC, opracowany na bazie hemoglobiny wołowej. Została pierwotnie wynaleziona na Uniwersytecie Maryland w 1999 roku, a następnie rozwijana przez OXYVITA Inc. w Middletown (NY, USA). Produkcja OxyVita opiera się na opatentowanej technologii polimeryzacji bezpośredniej (*zero-link polymerization technology*), w której zamiast środków wiążących używa się aktywatorów, prowadzących do stworzenia superpolimeru złożonego z tetramerów hemoglobiny. OxyVita to superpolimer o masie cząsteczkowej około 17 MDa.

Celem opracowania OxyVita była poprawa dostarczania tlenu w sytuacjach, w których transfuzja krwinek czerwonych była potrzebna, ale niedostępna lub niepożądana. Produkt zaprojektowano z myślą o eliminacji problemów związanych z wcześniejszymi, nieskutecznymi HBOC (Wollocko et al., 2022). OxyVita była testowana przez wiele niezależnych zespołów badawczych w różnych instytucjach przez ostatnie dwie dekady (Abutarboush et al., 2014), a niektóre projekty badawcze są nadal aktywnie prowadzone.

Mimo licznych prób i częściowych sukcesów pełne zatwierdzenie produktów jako substytutów krwi ludzkiej wciąż pozostaje wyzwaniem. Technologie te napotykają trudności związane z ograniczeniami technologicznymi, regulacyjnymi i finansowymi. Konieczne są dalsze badania, które pozwolą na opracowanie skutecznych, bezpiecznych i dostępnych rozwiązań, odpowiadających na rosnące potrzeby kliniczne.

**Wybrane aspekty badań nad sztuczną krwią: ograniczenia, postępy i perspektywy rozwoju.** Pomimo zaawansowanych badań nad sztuczną krwią, technologia ta nie jest jeszcze w stanie w pełni zastąpić wszystkich funkcji krwi ludzkiej, szczególnie w zakresie efektywnego transportu tlenu do tkanek, co stanowi podstawową funkcję krwi. Choć wyniki dotychczasowych badań są obiecujące, nadal nie udało się opracować substytutu, który byłby całkowicie bezpieczny dla organizmu ludzkiego. Stosowane preparaty krwiopochodne często prowadzą do poważnych komplikacji zdrowotnych.

**Skutki uboczne i ograniczenia substytutów krwi:**

- Związki perfluorowęglowe – Metabolity tych substancji mogą pozostawać w organizmie przez wiele miesięcy, co wiąże się z ryzykiem obniżenia liczby płytek krwi, gorączki oraz

zwiększenia ryzyka udarów mózgu. Charakteryzują się także krótkim czasem przechowywania oraz ograniczoną efektywnością w transporcie tlenu (Pidcoke et al., 2022)

▪ Substytuty na bazie hemoglobiny – Preparaty oparte na hemoglobinie powodują zwężenie naczyń krwionośnych, co prowadzi do niedotlenienia tkanek oraz nadciśnienia ogólnoustrojowego i płucnego. Ponadto, substytuty te intensyfikują produkcję wolnych rodników tlenowych, przyczyniając się do stresu oksydacyjnego. Inne skutki uboczne to nefrotoksyczność, zaburzenia żołądkowo-jelitowe oraz objawy grypopodobne (Yu et al., 2009; Khan et al., 2020).

Ograniczenia substytutów krwi obejmują także ich krótki czas działania – większość preparatów opartych na hemoglobinie utrzymuje się w organizmie tylko przez 20–30 godzin, podczas gdy pełna krew może funkcjonować przez około 34 dni. Dodatkowo, substytuty te nie potrafią odtworzyć zdolności krwi do zwalczania infekcji oraz tworzenia skrzepów, co ogranicza ich zastosowanie do interwencji krótkoterminowych (Baron, 1999).

**Postępy w badaniach nad sztuczną krwią.** Mimo licznych trudności związanych z opracowaniem pełnoprawnego substytutu krwi ludzkiej, prace badawcze wciąż trwają, a nowe rozwiązania technologiczne i biotechnologiczne wykazują obiecujące właściwości.

1. **Erythromer** – Innowacyjna biosyntetyczna hemoglobina w postaci nanokapsułek lipidowo-peptydowych, które kapsułkują hemoglobinę ludzką. Produkt ten charakteryzuje się długim okresem przydatności oraz możliwością szybkiej rekonstrukcji, co czyni go szczególnie przydatnym w warunkach bojowych. Erythromer znajduje się obecnie w fazie badań przedklinicznych, a testy kliniczne planowane są na koniec 2024 roku (ErythroMer, 2024).

2. **NanoSanguis** – Polska firma opracowuje syntetyczne mikrocząsteczki imitujące erythrocyty, które mogą pełnić funkcję czasowego substytutu krwi ludzkiej w przypadku jej znacznej utraty (<https://nawa.gov.pl>; <https://ec.europa.eu/>).

3. **Alternatywne źródła hemoglobiny** – Zainteresowanie budzi hemoglobina pozyskiwana z organizmów bezkręgowców, takich jak dżdżownice (*Lumbricus terrestris*) czy wieloszczety morskie (*Arenicola marina*). Hemoglobina tych organizmów nie posiada błony komórkowej, co czyni ją potencjalnym nośnikiem tlenu w ludzkiej krwi. Badania

wstępne wykazały jej bezpieczeństwo u zwierząt laboratoryjnych (Batoool et al., 2021).

Hemoglobina *Arenicola marina* (M101), znana komercyjnie jako HEMO<sub>2</sub>life® produkowana przez firmę Hemarina (Morlaix, Francja), efektywnie dostarcza tlen *in vivo* (Le Gall et al., 2014; Moon-Massat et al., 2017). Badania wykazały, że nie powoduje ona utleniania, skurczu naczyń ani nadciśnienia (Rousselot et al., 2006; Tsai et al., 2012). Dzięki dużym kieszeniom hemowym w cząsteczce hemoglobiny *A. marina*, tlen jest łatwo i pasywnie uwalniany (Gow et al., 2005; Xu et al., 2006). Należy zaznaczyć, że hemoglobina *A. marina* ma znacznie wyższe powinowactwo do tlenu niż hemoglobina ludzka, co wynika z jej niższej wartości p<sub>50</sub> wynoszącej 7,05 ± 0,93 mmHg. Dzięki temu, jej zdolność do dostarczania tlenu jest skierowana na bardziej hipoksyczne środowiska (Elmer et al., 2012). Co ciekawe, wartość p<sub>50</sub> M101 jest porównywalna z wartością p<sub>50</sub> hemoglobiny ludzkiej HbA wewnątrz erythrocytów, a jej kooperatywność również wykazuje podobne właściwości (Elmer et al., 2012; Batoool et al., 2021).

M101 wykazała swoją skuteczność jako dodatek do roztworów stosowanych do konserwacji narządów zarówno w warunkach statycznych, jak i perfuzyjnych, w trakcie przeszczepów narządów. Liczne badania *in vivo* na modelach przedklinicznych, obejmujące różne narządy, takie jak serce (Mallet et al., 2014), nerki (Jia et al., 2004; Alix et al., 2020), wątroba (Lemaire et al., 2019), trzustka (Thuillier et al., 2011) i płuca (Glorion et al., 2018), potwierdziły zdolność M101 do utrzymania oraz poprawy żywotności i funkcji przeszczepów.

Bezpieczeństwo i skuteczność M101 zostały także potwierdzone w badaniu klinicznym OXYOP (Clinical Trial Registry No. NCT 02652520), które dotyczyło procedury przeszczepu nerki. W badaniu tym dodano HEMO<sub>2</sub>life® – wyrób medyczny klasy III zawierający M101 (1 g/L) – do roztworu konserwującego (Le Meur et al., 2020). Ważne jest, że nie zaobserwowano żadnych działań immunologicznych, alergicznych ani prozakrzepowych związanych z użyciem M101. Ponadto, zastosowanie M101 zmniejszyło ryzyko opóźnionej funkcji przeszczepu i poprawiło funkcję nerek (Le Meur et al., 2020). Wyniki te potwierdzają bezpieczeństwo i skuteczność M101 oraz wskazują na jej potencjalne zastosowania kliniczne. Dodatkowo, M101 została zaproponowana jako natychmiastowy substy-

tut krwi dla rannych żołnierzy armii USA (Sen Gupta, 2019).

Interesującym przypadkiem wykorzystania HEMO<sub>2</sub>life<sup>®</sup> była jej aplikacja w celu ochrony przeszczepu twarzy podczas retransplantacji całkowitej twarzy. W styczniu 2018 roku przeprowadzono transplantację, wykorzystując przeszczep zabezpieczony za pomocą HEMO<sub>2</sub>life<sup>®</sup>. Operacja zakończyła się sukcesem, a 30 miesięcy po zabiegu pacjent pozostaje w dobrym stanie, bez oznak odrzutu przeszczepu (Lantieri et al., 2020). Niedawno M101 zaproponowano również jako "molekularny respirator", potencjalne wsparcie dla pacjentów z COVID-19 w walce z hipoksemią (Lupon et al., 2021). Przeprowadzenie badań nad tą hipotezą może być kluczowe dla opracowania potencjalnej strategii terapeutycznej zwalczającej kryzys związany z COVID-19.

Z uwagi na interesującą zdolność transportu O<sub>2</sub>, potencjał M101 jako transportera tlenu w różnych patologiach związanych z hipokseją wymaga szczegółowych badań. Ponadto, jego możliwości jako terapeutycznego nośnika tlenu w sytuacjach związanych z masywnym krwotokiem, takich jak wypadki, ataki terrorystyczne czy urazy wojenne, powinny być dogłębnie zbadane. Potencjalne użycie M101 jako tymczasowej lub interwencyjnej alternatywy w celu ograniczenia niepożądanych skutków ubocznych patologii wymagających częstych transfuzji krwi wymaga dalszych badań. Dodatkowo, biorąc pod uwagę niedawno odkryte właściwości przeciwzapalne i antybakteryjne tego związku, konieczne są dalsze badania nad jego potencjałem terapeutycznym w leczeniu chorób zapalnych i infekcyjnych (Batoool et al., 2021).

Aby sztuczna krew była bezpieczna i skuteczna, kluczowe są odpowiednie metody poprawy jej stabilności oraz redukcji toksyczności. Jednym z najważniejszych podejść jest modyfikacja chemiczna hemoglobiny, na przykład poprzez PEGylację, która zwiększa jej stabilność oraz zmniejsza immunogenność, ograniczając ryzyko niepożądanych reakcji organizmu. Kolejnym rozwiązaniem jest wykorzystanie nanotechnologii do kapsułkowania hemoglobiny w biokompatybilnych nośnikach, co zapobiega jej toksycznemu utlenianiu i przedłuża czas działania w organizmie (Gomes et al., 2024).

Lepsze systemy buforujące odgrywają istotną rolę w regulacji pH oraz eliminacji wolnych rodników, które mogą prowadzić do cytotoksyczności. Dzięki temu możliwe jest

zmniejszenie negatywnego wpływu sztucznej krwi na organizm. Ponadto, optymalizacja składu perfluorowęglowodorów pozwala na zapewnienie lepszej rozpuszczalności tlenu, jednocześnie minimalizując ryzyko działań niepożądanych. Wszystkie te metody wspólnie przyczyniają się do zwiększenia efektywności i bezpieczeństwa sztucznej krwi, przybliżając jej praktyczne zastosowanie w medycynie (Gomes et al., 2024).

**Potencjalne zastosowania substytutów krwi.** Badania nad substytutami krwi sugerują, że mogą one być wykorzystywane w wielu dziedzinach medycyny i nauki, w tym do:

- leczenia urazów mózgu i niedokrwienia mięśnia sercowego,
- poprawy utlenowania tkanek w przewlekłej niewydolności tętniczej,
- pozaustrojowej perfuzji narządów przeznaczonych do transplantacji,
- zwiększenia efektywności radioterapii nowotworów przez lepsze utlenowanie guzów (Dong and Stowell, 2002).

Produkcja sztucznej krwi jest obecnie procesem kosztownym, co stanowi jedno z największych wyzwań w jej komercjalizacji. Koszty hodowli erytrocytów z komórek macierzystych są wysokie ze względu na konieczność stosowania specjalistycznych mediów hodowlanych oraz długotrwały proces namnażania komórek. Dodatkowo technologie oparte na syntetycznych nośnikach tlenu wymagają kosztownych badań nad ich stabilnością i bezpieczeństwem.

Obecnie produkcja jednostki sztucznej krwi znacząco przewyższa koszty standardowej transfuzji, jednak rozwój technologii i zwiększenie skali produkcji mogą w przyszłości obniżyć te wydatki. Istnieje także potrzeba dalszych inwestycji w innowacyjne metody wytwarzania oraz optymalizację procesów produkcyjnych. Długoterminowo, sztuczna krew może stać się opłacalnym rozwiązaniem, zwłaszcza w kontekście rosnącego zapotrzebowania na bezpieczne alternatywy dla tradycyjnych transfuzji.

**Perspektywy rozwoju.** Pomimo wcześniejszych niepowodzeń, badania nad sztuczną krwią są kontynuowane. Przyszłość tej technologii może obejmować nie tylko opracowanie skutecznych i bezpiecznych substytutów krwi, ale także rozwój innowacyjnych rozwiązań, takich jak sztuczne płytki krwi, białe krwinki czy erytrocyty produkowane z komórek macierzystych. Innowacje te mogą stanowić

odpowiedź na aktualne problemy związane z toksycznością i ograniczoną efektywnością istniejących preparatów (Kresie, 2001; Sarkar, 2008; Gomes et al., 2024).

Rozwój technologii sztucznej krwi wymaga intensywnych badań nad zwiększeniem efektywności syntetycznych nośników tlenu, optymalizacją biotechnologicznej produkcji erytrocytów oraz udoskonaleniem biomimetycznych rozwiązań opartych na nanotechnologii. Postęp w tych obszarach może przyczynić się do stworzenia alternatywnych źródeł krwi o wysokiej skuteczności klinicznej i szerokim zastosowaniu medycznym (Gomes et al., 2024).

Kluczowe technologie wymagające udoskonalenia obejmują syntetyczne nośniki tlenu, biotechnologiczną produkcję erytrocytów oraz wykorzystanie nanotechnologii i biomateriałów. Syntetyczne nośniki tlenu, takie jak perfluorowęglowodory i hemoglobina rekombinowana, stanowią jedną z najbardziej obiecujących metod zastępowania naturalnych krwinek czerwonych. Jednak ich ograniczona zdolność do przenoszenia tlenu w sposób porównywalny do naturalnych erytrocytów oraz krótki czas krążenia w organizmie stanowią istotne bariery technologiczne. Konieczne jest dalsze udoskonalanie tych związków, aby zwiększyć ich efektywność oraz ograniczyć działania niepożądane (Gomes et al., 2024).

Biotechnologiczna produkcja erytrocytów z komórek macierzystych jest kolejną innowacyjną strategią, jednak jej wdrożenie na skalę kliniczną napotyka na poważne trudności. Główne wyzwania obejmują niską wydajność produkcji krwinek oraz wysokie koszty hodowli. Optymalizacja procesów namnażania komórek, automatyzacja produkcji oraz rozwój bardziej efektywnych bioreaktorów mogą znacząco poprawić opłacalność tej technologii (Gomes et al., 2024).

Nanotechnologia i biomateriały stanowią perspektywiczne podejście do opracowania biomimetycznych erytrocytów, które mogłyby naśladować naturalne funkcje czerwonych krwinek. Ich stabilność oraz kompatybilność z układem immunologicznym pozostają jednak kluczowymi wyzwaniami, które wymagają dalszych badań. W szczególności należy opracować innowacyjne powłoki ochronne oraz zoptymalizować ich strukturę, aby zapewnić odpowiednią funkcjonalność i bezpieczeństwo stosowania (Gomes et al., 2024).

**Wyzwania i ograniczenia w rozwoju substytutów krwinek czerwonych.** Wszystkie

substytuty krwinek czerwonych, które dotychczas przeszły badania kliniczne, zawierają składniki, które nie są strukturami komórkowymi. Podstawowe mechanizmy transportu tlenu różnią się od tych występujących w warunkach fizjologicznych. Te substytuty znikają z układu krążenia po kilku godzinach, w najlepszym przypadku po kilku dniach, co znacząco ogranicza możliwość ich praktycznego zastosowania. Brakuje pełnych danych dotyczących bezpieczeństwa ich stosowania (Kim and Greenburg, 2004; Cabrales and Intaglietta, 2013). W badaniach klinicznych wymagana jest szczególna ostrożność. Ocena skuteczności tych preparatów jest utrudniona z powodu braku powszechnie akceptowanych kryteriów oceny. Żaden z aktualnie badanych preparatów nie został dopuszczony do rutynowego stosowania u ludzi w Polsce, krajach Europy Zachodniej ani w Stanach Zjednoczonych (Cabrales and Intaglietta, 2013).

Hemopure, opracowany przez firmę Biopure Corp., zawiera chemicznie stabilizowaną, usieciowaną hemoglobinę wołową (krowią) w roztworze soli i jest przeznaczony do stosowania u ludzi. Firma ta opracowała także analogiczny produkt pod nazwą handlową Oxyglobin, przeznaczony do użytku weterynaryjnego u psów. Oxyglobin został zatwierdzony w Stanach Zjednoczonych i Europie, a jego wprowadzenie do klinik weterynaryjnych oraz szpitali miało miejsce w marcu 1998 roku. Hemopure uzyskał aprobatę w Republice Południowej Afryki oraz Rosji (Sprung et al., 2002; Jahr et al., 2021; Chen et al., 2023). Warto zaznaczyć, że istniały wcześniej inne produkty klinicznie zatwierdzone, jednak ich sprzedaż została przerwana z powodu skutków ubocznych (Chen et al., 2023).

Spośród produktów opartych na hemoglobinie do dostarczania tlenu, HemAssist, PolyHeme, Hemolink, Hemospan i Hemoximer zostały wycofane z użycia. Hemopure jest dopuszczony do stosowania klinicznego w Rosji i Republice Południowej Afryki, a jego bliźniaczy produkt Oxyglobin (ten sam skład co Hemopure, ale pod inną nazwą handlową) został zatwierdzony do użytku weterynaryjnego w Stanach Zjednoczonych oraz Unii Europejskiej (Jahr et al., 2021). HemO<sub>2</sub>life<sup>®</sup> niedawno uzyskał aprobatę do stosowania w konserwacji narządów podczas transplantacji w Unii Europejskiej, a jego twórcy starają się o zatwierdzenie tego produktu do leczenia ciężkich stanów anemii. Produkty OxyVita i Sanguinate pozostają nadal w aktywnej fazie badań klinicznych.

Można mieć nadzieję, że nadchodzące 10–20 lat przyniesie dynamiczny rozwój w dziedzinie terapii tlenowych (Chen et al., 2023).

Rozwój sztucznych krwinek czerwonych napotyka poważne trudności, głównie ze względu na działania niepożądane, takie jak toksyczność w organizmie. Istnieje kilka produktów, które uzyskały warunkową aprobatę w Rosji i Afryce, jednak ich stosowanie wiąże się z wysokim ryzykiem – śmiertelność w przypadku ich użycia sięga około 50% (Kim et al., 2008).

### Podsumowanie

Sztuczna krew, czyli substytuty krwinek czerwonych, stanowi obiecującą alternatywę dla tradycyjnych transfuzji krwi, szczególnie w sytuacjach, gdy dostęp do krwi jest ograniczony lub jej transfuzja jest niemożliwa. Mimo wielu lat intensywnych badań, rozwój sztucznej krwi napotkał szereg trudności związanych zarówno z technologią produkcji, jak i kwestiami bezpieczeństwa oraz skuteczności. Istniejące substytuty krwinek czerwonych, które przeszły badania kliniczne, charakteryzują się licznymi ograniczeniami, które nadal uniemożliwiają ich powszechne zastosowanie w medycynie.

Dotychczasowe substytuty krwinek czerwonych są oparte na komponentach bez struktury komórkowej, co stanowi podstawową różnicę w porównaniu do naturalnych krwinek czerwonych. Te syntetyczne substytuty pełnią funkcję transportu tlenu, jednak mechanizmy, które wykorzystują, znacznie odbiegają od fizjologicznych procesów zachodzących w organizmach ludzi. Ich skuteczność w przenoszeniu tlenu jest mniejsza, a dodatkowo czas ich obecności w układzie krążenia jest krótki. Większość substytutów znika z organizmu w ciągu kilku godzin, a w najlepszym przypadku – po kilku dniach, co znacznie ogranicza ich praktyczne zastosowanie w medycynie.

Brak pełnych danych na temat bezpieczeństwa stosowania substytutów krwi stanowi kolejny poważny problem. Chociaż niektóre preparaty uzyskały dopuszczenie do stosowania w wybranych krajach, takich jak RPA czy

Rosja, ich długoterminowe bezpieczeństwo oraz wpływ na organizm pozostają nie w pełni poznane. Wymaga to dalszych badań, które muszą być prowadzone z zachowaniem szczególnej ostrożności, aby nie narażać pacjentów na poważne skutki uboczne. Również ocena skuteczności sztucznej krwi jest utrudniona z powodu braku powszechnie uznawanych kryteriów oceny tego typu preparatów. Do tej pory nie opracowano jednoznacznych norm, które pozwoliłyby na porównanie skuteczności różnych substytutów krwinek czerwonych.

Pomimo tych trudności, niektóre preparaty, takie jak Hemopure, opracowany przez firmę Biopure Corp., osiągnęły pewne sukcesy. Hemopure, który zawiera usieciowaną hemoglobinę wołową w roztworze soli, uzyskał aprobatę do stosowania w Afryce Południowej i Rosji, choć jego użycie nadal wiąże się z ryzykiem. Dodatkowo, produkt Oxyglobin, przeznaczony do użytku weterynaryjnego, został zatwierdzony w Stanach Zjednoczonych i Europie, gdzie znalazł zastosowanie w leczeniu psów.

Należy również zauważyć, że w przeszłości istniały inne produkty sztucznej krwi, które otrzymały aprobatę, lecz ich sprzedaż została wstrzymana z powodu działań niepożądanych, takich jak toksyczność. Do tej pory nie udało się uzyskać preparatu, który mógłby być powszechnie stosowany u ludzi i zatwierdzony przez odpowiednie władze, takie jak FDA.

Obecny stan technologii substytutów krwinek czerwonych wskazuje na konieczność dalszego rozwoju i poszukiwania nowych, bardziej stabilnych oraz bezpiecznych produktów. Istnieje wiele potencjalnych możliwości, które mogą pozwolić na poprawę jakości sztucznej krwi. Jednak wyzwania związane z toksycznością, czasem przechowywania oraz kosztami produkcji wciąż pozostają trudne do przezwyciężenia. Z tego względu, choć sztuczna krew oferuje ogromny potencjał w medycynie, jej pełne wprowadzenie do powszechnego użytku może wymagać jeszcze wielu lat badań i dalszego rozwoju technologii.

### Фінансування / Funding

Це дослідження не отримало зовнішнього фінансування / This research received no external funding.

### Заява про доступність даних / Data Availability Statement

Набір даних доступний за запитом до авторів / Dataset available on request from the authors.

**Заява інституційної ревізійної ради / Institutional Review Board Statement**

Не застосовується / Not applicable.

**Заява про інформовану згоду / Informed Consent Statement**

Не застосовується / Not applicable.

**Конфлікт інтересів / Conflicts of Interest**

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів / The authors declare no conflicts of interest.

**References**

- Abutarboush, R., Aligbe, C., Pappas, G., Saha, B., Arnaud, F., Haque, A., Aufer, C., McCarron, R., Scultetus, A., & Moon-Massat, P. (2014). Effects of the Oxygen-Carrying Solution OxyVita C on the Cerebral Microcirculation and Systemic Blood Pressures in Healthy Rats. *Journal of functional biomaterials*, 5(4), 246–258. <https://doi.org/10.3390/jfb5040246>
- Alix, P., Val-Laillet, D., Turlin, B., Ben Mosbah, I., Burel, A., Bobillier, E., Bendavid, C., Delpy, E., Zal, F., Corlu, A., & Boudjema, K. (2020). Adding the oxygen carrier M101 to a cold-storage solution could be an alternative to HOPE for liver graft preservation. *JHEP reports: innovation in hepatology*, 2(4), 100119. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100119>
- Amberson, W. R., Jennings, J. J., & Rhode, C. M. (1949). Clinical experience with hemoglobin-saline solutions. *Journal of applied physiology*, 1(7), 469–489. <https://doi.org/10.1152/jappl.1949.1.7.469>
- Amberson, W. R., Mulder, A. G., Steggerda, F. R., Flexner, J., & Pankratz, D. S. (1933). Mammalian life without red blood corpuscles. *Science (New York, N.Y.)*, 78(2014), 106–107. <https://doi.org/10.1126/science.78.2014.106>
- Arifin, D. R., & Palmer, A. F. (2005). Polymersome encapsulated hemoglobin: a novel type of oxygen carrier. *Biomacromolecules*, 6(4), 2172–2181. <https://doi.org/10.1021/bm0501454>
- Artificial Blood from the Warsaw University of Technology. <https://nawa.gov.pl/en/snapy/artificial-blood-from-the-warsaw-university-of-technology>
- Astruc, D., Boisselier, E., & Ornelas, C. (2010). Dendrimers designed for functions: from physical, photophysical, and supramolecular properties to applications in sensing, catalysis, molecular electronics, photonics, and nanomedicine. *Chemical reviews*, 110(4), 1857–1959. <https://doi.org/10.1021/cr900327d>
- Azuma, H., & Sakai, H. (2019). [Translational research for artificial red blood cells (hemoglobin vesicles)] [Rinsho ketsueki]. *The Japanese journal of clinical hematology*, 60(9), 1084–1091. <https://doi.org/10.11406/rinketsu.60.1084>
- Baron J. F. (1999). Blood substitutes. Haemoglobin therapeutics in clinical practice. *Critical care (London, England)*, 3(5), R99–R102. <https://doi.org/10.1186/cc365>
- Batool, F., Delpy, E., Zal, F., Leize-Zal, E., & Huck, O. (2021). Therapeutic Potential of Hemoglobin Derived from the Marine Worm *Arenicola marina* (M101): A Literature Review of a Breakthrough Innovation. *Marine drugs*, 19(7), 376. <https://doi.org/10.3390/md19070376>
- Biro, G. P., & Blais, P. (1987). Perfluorocarbon blood substitutes. *Critical reviews in oncology/hematology*, 6(4), 311–374. [https://doi.org/10.1016/s1040-8428\(87\)80018-5](https://doi.org/10.1016/s1040-8428(87)80018-5)



- Bloch, E. M., Vermeulen, M., & Murphy, E. (2012). Blood transfusion safety in Africa: a literature review of infectious disease and organizational challenges. *Transfusion medicine reviews*, 26(2), 164–180. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2011.07.006>
- Bobofchak, K. M., Mito, T., Texel, S. J., Bellelli, A., Nemoto, M., Traystman, R. J., Koehler, R. C., Brinigar, W. S., & Fronticelli, C. (2003). A recombinant polymeric hemoglobin with conformational, functional, and physiological characteristics of an *in vivo* O<sub>2</sub> transporter. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 285(2), H549–H561. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00037.2003>
- Bonsen, P., Laver, M., Morris, K., inventors; Alza Corporation, assignee. Novel polymerized, cross-linked, stroma-free hemoglobin. United States, 1975
- Bowman R. J. (1983). Red blood cell substitutes and artificial blood. *Human pathology*, 14(3), 218–220. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(83\)80020-3](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(83)80020-3)
- Boykins, R. A., Buehler, P. W., Jia, Y., Venable, R., & Alayash, A. I. (2005). O-raffinose crosslinked hemoglobin lacks site-specific chemistry in the central cavity: structural and functional consequences of beta93Cys modification. *Proteins*, 59(4), 840–855. <https://doi.org/10.1002/prot.20453>
- Browdie, D., & Smith, H. (1975). Stroma-free hemoglobin. Simplified preparation and *in vivo* and *in vitro* effects on coagulation in rabbits. *American journal of surgery*, 129(4), 365–368. [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(75\)90178-6](https://doi.org/10.1016/0002-9610(75)90178-6)
- Bunn, H. F., & Jandl, J. H. (1968). The renal handling of hemoglobin. *Transactions of the Association of American Physicians*, 81, 147–152
- Burhop K. (2022). Development of Recombinant Hemoglobin-Based Oxygen Carriers-Somatogen: Studies and Lessons Learned. In: Liu H., Kaye A.D., Jahr J.S., editors. *Blood Substitutes and Oxygen Biotherapeutics*. Springer
- Cabrales, P., & Intaglietta, M. (2013). Blood substitutes: evolution from noncarrying to oxygen- and gas-carrying fluids. *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs: 1992)*, 59(4), 337–354. <https://doi.org/10.1097/MAT.0b013e318291fbaa>
- Carmichael, F. J., Ali, A. C., Campbell, J. A., Langlois, S. F., Biro, G. P., Willan, A. R., Pierce, C. H., & Greenburg, A. G. (2000). A phase I study of oxidized raffinose cross-linked human hemoglobin. *Critical care medicine*, 28(7), 2283–2292. <https://doi.org/10.1097/00003246-200007000-00017>
- Chang T. M. (1992). Blood substitutes based on modified hemoglobin prepared by encapsulation or crosslinking: an overview. *Biomaterials, artificial cells, and immobilization biotechnology: official journal of the International Society for Artificial Cells and Immobilization Biotechnology*, 20(2-4), 159–179. <https://doi.org/10.3109/10731199209119634>
- Chang T. M. (2003). Future generations of red blood cell substitutes. *Journal of internal medicine*, 253(5), 527–535. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2003.01151.x>
- Chang T. M. (2006). Blood substitutes based on nanobiotechnology. *Trends in biotechnology*, 24(8), 372–377. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.06.005>
- Chang, T. M., Powanda, D., & Yu, W. P. (2003). Analysis of polyethylene-glycol-poly lactide nano-dimension artificial red blood cells in maintaining systemic hemoglobin levels and prevention of methemoglobin formation. *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology*, 31(3), 231–247. <https://doi.org/10.1081/bio-120023155>

- Chen, J. Y., Scerbo, M., & Kramer, G. (2009). A review of blood substitutes: examining the history, clinical trial results, and ethics of hemoglobin-based oxygen carriers. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 64(8), 803–813. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322009000800016>
- Chen, J., Pan, H., Lanza, G. M., & Wickline, S. A. (2013). Perfluorocarbon nanoparticles for physiological and molecular imaging and therapy. *Advances in chronic kidney disease*, 20(6), 466–478. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2013.08.004>
- Chen, L., Yang, Z., & Liu, H. (2023). Hemoglobin-Based Oxygen Carriers: Where Are We Now in 2023?. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 59(2), 396. <https://doi.org/10.3390/medicina59020396>
- Clark, L. C., Jr, & Gollan, F. (1966). Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science (New York, N.Y.)*, 152(3730), 1755–1756. <https://doi.org/10.1126/science.152.3730.1755>
- Cohn, C. S., & Cushing, M. M. (2009). Oxygen therapeutics: perfluorocarbons and blood substitute safety. *Critical care clinics*, 25(2). <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2008.12.007>
- Cooper, C. E., Bird, M., Sheng, X., Choi, J. W., Silkstone, G. G. A., Simons, M., Syrett, N., Piano, R., Ronda, L., Bettati, S., Paredi, G., Mozzarelli, A., & Reeder, B. J. (2021). Stability of Maleimide-PEG and Mono-Sulfone-PEG Conjugation to a Novel Engineered Cysteine in the Human Hemoglobin Alpha Subunit. *Frontiers in chemistry*, 9, 707797. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.707797>
- Dellinger, E. P., & Anaya, D. A. (2004). Infectious and immunologic consequences of blood transfusion. *Critical care (London, England)*, 8 Suppl. 2(Suppl. 2), S18–S23. <https://doi.org/10.1186/cc2847>
- Dong, Q., & Stowell, C. P. (2002). Blood substitutes. What they are and how they might be used. *American journal of clinical pathology*, 118 Suppl., S71–S80. <https://doi.org/10.1309/6P2J-2B1K-GU0T-M5PR>
- Elmer, J., Palmer, A. F., & Cabrales, P. (2012). Oxygen delivery during extreme anemia with ultra-pure earthworm hemoglobin. *Life sciences*, 91(17-18), 852–859. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.08.036>
- ErythroMer: Nanoscale BioSynthetic Red Cell Substitute, 2024. Project Number 5R44HL135965-05; Former Number 2R44HL135965-04; Contact PI/Project Leader: ALP, ESMA; Awardee Organization: KALOCYTE, INC. Available: <https://reporter.nih.gov/project-details/10844356#details>
- Faggiano, S., Ronda, L., Bruno, S., Abbruzzetti, S., Viappiani, C., Bettati, S., & Mozzarelli, A. (2022). From hemoglobin allostery to hemoglobin-based oxygen carriers. *Molecular aspects of medicine*, 84, 101050. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2021.101050>
- Fronticelli, C., & Koehler, R. C. (2009). Design of recombinant hemoglobins for use in transfusion fluids. *Critical care clinics*, 25(2). <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2008.12.010>
- Frost, A. T., Jacobsen, I. H., Worberg, A., & Martínez, J. L. (2018). How Synthetic Biology and Metabolic Engineering Can Boost the Generation of Artificial Blood Using Microbial Production Hosts. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 6, 186. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00186>
- Gasparovic Babic, S., Krsek, A., & Baticic, L. (2024). Voluntary Blood Donation in Modern Healthcare: Trends, Challenges, and Opportunities. *Epidemiologia (Basel, Switzerland)*, 5(4), 770–784. <https://doi.org/10.3390/epidemiologia5040052>

- Glorion, M., Polard, V., Favereau, F., Hauet, T., Zal, F., Fadel, E., & Sage, E. (2018). Prevention of ischemia-reperfusion lung injury during static cold preservation by supplementation of standard preservation solution with HEMO<sub>2</sub>life® in pig lung transplantation model. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(8), 1773–1780. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1392315>
- Gomes, F. L., Jeong, S. H., Shin, S. R., Leijten, J., & Jonkheijm, P. (2024). Engineering Synthetic Erythrocytes as Next-Generation Blood Substitutes. *Advanced functional materials*, 34(28), 2315879. <https://doi.org/10.1002/adfm.202315879>
- Gow, A. J., Payson, A. P., & Bonaventura, J. (2005). Invertebrate hemoglobins and nitric oxide: how heme pocket structure controls reactivity. *Journal of inorganic biochemistry*, 99(4), 903–911. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.12.001>
- Graves, P. E., Henderson, D. P., Horstman, M. J., Solomon, B. J., & Olson, J. S. (2008). Enhancing stability and expression of recombinant human hemoglobin in *E. coli*: Progress in the development of a recombinant HBOC source. *Biochimica et biophysica acta*, 1784(10), 1471–1479. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.04.012>
- Guidelines Review Committee. Towards 100% Voluntary Blood Donation: A Global Framework for Action. World Health Organization; Geneva, Switzerland: 2010. [(accessed on 7 October 2024)]. Available online: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241599696>
- Haldar, R., Gupta, D., Chitranshi, S., Singh, M. K., & Sachan, S. (2019). Artificial Blood: A Futuristic Dimension of Modern Day Transfusion Sciences. *Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry*, 17(1), 11–16. <https://doi.org/10.2174/1871525717666190617120045>
- Hegedüs, I., Dojcsak, É.K.-T., Szalai, A.J., et al. (2014). Single haemoglobin nanocapsules as test materials for artificial blood. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 58(suppl.), 11
- Highsmith, F. A., Driscoll, C. M., Chung, B. C., Chavez, M. D., Macdonald, V. W., Manning, J. M., Lippert, L. E., Berger, R. L., & Hess, J. R. (1997). An improved process for the production of sterile modified haemoglobin solutions. *Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization*, 25(3), 257–268. <https://doi.org/10.1006/biol.1997.0096>
- Hill, S. E., Gottschalk, L. I., & Grichnik, K. (2002). Safety and preliminary efficacy of hemoglobin raffimer for patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*, 16(6), 695–702. <https://doi.org/10.1053/jcan.2002.128416>
- Hoffman, S. J., Looker, D. L., Roehrich, J. M., Cozart, P. E., Durfee, S. L., Tedesco, J. L., & Stetler, G. L. (1990). Expression of fully functional tetrameric human hemoglobin in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(21), 8521–8525. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.21.8521>
- InformedHealth.org [Internet]. Cologne, Germany: Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG); 2006-. In brief: What does blood do? [Updated 2023 Mar 16]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279392/>
- Jägers, J., Wrobeln, A., & Ferenz, K. B. (2021). Perfluorocarbon-based oxygen carriers: from physics to physiology. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 473(2), 139–150. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02482-2>

- Jahr, J. S., Guinn, N. R., Lowery, D. R., Shore-Lesserson, L., & Shander, A. (2021). Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics: A Review. *Anesthesia and analgesia*, 132(1), 119–129. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000003957>
- Jahr, J. S., Walker, V., & Manoochehri, K. (2007). Blood substitutes as pharmacotherapies in clinical practice. *Current opinion in anaesthesiology*, 20(4), 325–330. <https://doi.org/10.1097/ACO.0b013e328172225a>
- Jansman, M. M. T., & Hosta-Rigau, L. (2018). Recent and prominent examples of nano- and microarchitectures as hemoglobin-based oxygen carriers. *Advances in colloid and interface science*, 260, 65–84. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.08.006>
- Jia, Y., Ramasamy, S., Wood, F., Alayash, A. I., & Rifkind, J. M. (2004). Cross-linking with O-raffinose lowers oxygen affinity and stabilizes haemoglobin in a non-cooperative T-state conformation. *The Biochemical journal*, 384(Pt 2), 367–375. <https://doi.org/10.1042/BJ20040612>
- Kakaei, N., Amirian, R., Azadi, M., Mohammadi, G., & Izadi, Z. (2023). Perfluorocarbons: A perspective of theranostic applications and challenges. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 11, 1115254. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1115254>
- Khan, F., Singh, K., & Friedman, M. T. (2020). Artificial Blood: The History and Current Perspectives of Blood Substitutes. *Discoveries (Craiova, Romania)*, 8(1), e104. <https://doi.org/10.15190/d.2020.1>
- Kim, H. W., & Greenburg, A. G. (2004). Artificial oxygen carriers as red blood cell substitutes: a selected review and current status. *Artificial organs*, 28(9), 813–828. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2004.07345.x>
- Kozłowska, K., Wojta-Kempa, M. (2011). Wiedza i postawy studentów wrocławskich uczelni na temat krwiodawstwa [Knowledge and Attitudes Concerning the Blood Donation Among Students of Wrocław]. *Pielęgniarstwo i Zdrowie Publiczne*, 1(2), 121-128
- Kresie L. (2001). Artificial blood: an update on current red cell and platelet substitutes. *Proceedings (Baylor University. Medical Center)*, 14(2), 158–161. <https://doi.org/10.1080/08998280.2001.11927754>
- Lane T. A. (1995). Perfluorochemical-based artificial oxygen carrying red cell substitutes. *Transfusion science*, 16(1), 19–31. [https://doi.org/10.1016/0955-3886\(94\)00067-t](https://doi.org/10.1016/0955-3886(94)00067-t)
- Lang, M. E., Korecky, B., Anderson, P. J., & Biro, G. P. (1990). Stroma-free hemoglobin solutions prepared by crystallization and ultrafiltration methods; comparison of composition and coronary vasoconstrictor potency. *Advances in experimental medicine and biology*, 277, 225–236. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8181-5\\_28](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8181-5_28)
- Lantieri, L., Cholley, B., Lemogne, C., Guillemain, R., Ortonne, N., Grimbert, P., Thervet, E., & Lellouch, A. G. (2020). First human facial retransplantation: 30-month follow-up. *Lancet (London, England)*, 396(10264), 1758–1765. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32438-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32438-7)
- Latson G. W. (2019). Perftoran (Vidaphor)-Introduction to Western Medicine. *Shock (Augusta, Ga.)*, 52(1S Suppl. 1), 65–69. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001063>
- Le Gall, T., Polard, V., Rousselot, M., Lotte, A., Raouane, M., Lehn, P., Opolon, P., Leize, E., Deutsch, E., Zal, F., & Montier, T. (2014). *In vivo* biodistribution and oxygenation potential of a new generation of oxygen carrier. *Journal of biotechnology*, 187, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.07.008>

- Le Meur, Y., Badet, L., Essig, M., Thierry, A., Büchler, M., Drouin, S., Deruelle, C., Morelon, E., Pesteil, F., Delpech, P. O., Boutin, J. M., Renard, F., & Barrou, B. (2020). First-in-human use of a marine oxygen carrier (M101) for organ preservation: A safety and proof-of-principle study. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 20(6), 1729–1738. <https://doi.org/10.1111/ajt.15798>
- Lemaire, F., Sigrist, S., Delpy, E., Cherfan, J., Peronet, C., Zal, F., Bouzakri, K., Pinget, M., & Maillard, E. (2019). Beneficial effects of the novel marine oxygen carrier M101 during cold preservation of rat and human pancreas. *Journal of cellular and molecular medicine*, 23(12), 8025–8034. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14666>
- Li, S., Nickels, J., & Palmer, A. F. (2005). Liposome-encapsulated actin-hemoglobin (LEAcHb) artificial blood substitutes. *Biomaterials*, 26(17), 3759–3769. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.09.015>
- Lowe K. C. (1999). Perfluorinated blood substitutes and artificial oxygen carriers. *Blood reviews*, 13(3), 171–184. <https://doi.org/10.1054/blre.1999.0113>
- Lowe, K.C. (2006). Blood substitutes: from chemistry to clinic. *Journal of Materials Chemistry*, 16(43), 4189–4196
- Lupon, E., Lellouch, A. G., Zal, F., Cetrulo, C. L., Jr, & Lantieri, L. A. (2021). Combating hypoxemia in COVID-19 patients with a natural oxygen carrier, HEMO<sub>2</sub>Life® (M101). *Medical hypotheses*, 146, 110421. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110421>
- Macciò, A., & Madeddu, C. (2012). Management of anemia of inflammation in the elderly. *Anemia*, 2012, 563251. <https://doi.org/10.1155/2012/563251>
- Makowicz, D., Dziubaszewska, R., Lisowicz, K., & Makowicz, N. (2022). Wpływ regularnego oddawania krwi na organizm ludzki w opinii krwiodawców. *Journal of Transfusion Medicine*, 15(2), 141-149
- Mallet, V., Dutheil, D., Polard, V., Rousselot, M., Leize, E., Hauet, T., Goujon, J. M., & Zal, F. (2014). Dose-ranging study of the performance of the natural oxygen transporter HEMO<sub>2</sub> Life in organ preservation. *Artificial organs*, 38(8), 691–701. <https://doi.org/10.1111/aor.12307>
- Mer, M., Hodgson, E., Wallis, L., Jacobson, B., Levien, L., Snyman, J., Sussman, M. J., James, M., van Gelder, A., Allgaier, R., & Jahr, J. S. (2016). Hemoglobin glutamer-250 (bovine) in South Africa: consensus usage guidelines from clinician experts who have treated patients. *Transfusion*, 56(10), 2631–2636. <https://doi.org/10.1111/trf.13726>
- Mohandas, N., & Gallagher, P. G. (2008). Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 112(10), 3939–3948. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166>
- Moon-Massat, P., Mullah, S. H., Abutarboush, R., Saha, B. K., Pappas, G., Haque, A., Aufer, C., McCarron, R. M., Arnaud, F., & Scultetus, A. (2017). Cerebral Vasoactivity and Oxygenation with Oxygen Carrier M101 in Rats. *Journal of neurotrauma*, 34(19), 2812–2822. <https://doi.org/10.1089/neu.2015.3908>
- Moradi, S., Jahanian-Najafabadi, A., & Roudkenar, M. H. (2016). Artificial Blood Substitutes: First Steps on the Long Route to Clinical Utility. *Clinical medicine insights. Blood disorders*, 9, 33–41. <https://doi.org/10.4137/CMBD.S38461>

- Mushlin, P. S., Boucek, R. J., Jr, Parrish, M. D., Graham, T. P., Jr, & Olson, R. D. (1985). Beneficial effects of perfluorochemical artificial blood on cardiac function following coronary occlusion. *Life sciences*, 36(22), 2093–2102. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(85\)90305-4](https://doi.org/10.1016/0024-3205(85)90305-4)
- Nelson, D., Azari, M., Brown, R., Burhop, K., Bush, S., Catarello, J., Chuang, H., Downing, C., Estep, T., & Loewen, A. (1992). Preparation and characterization of diaspirin cross-linked hemoglobin solutions for preclinical studies. *Biomaterials, artificial cells, and immobilization biotechnology: official journal of the International Society for Artificial Cells and Immobilization Biotechnology*, 20(2-4), 423–427. <https://doi.org/10.3109/10731199209119662>
- Niechwiadowicz-Czapka T., Klimczyk A. *Leczenie krwiq*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2011, s. 81-96
- Nishimura, N., Nitsuno, T., Naito, R. (1981). Clinical studies of a perfluorochemical, whole blood substitute. *Critical Care Medicine*, 9(3), 168
- Osaro, E., & Charles, A. T. (2011). The challenges of meeting the blood transfusion requirements in Sub-Saharan Africa: the need for the development of alternatives to allogenic blood. *Journal of blood medicine*, 2, 7–21. <https://doi.org/10.2147/JBM.S17194>
- Patton, J. N., & Palmer, A. F. (2005). Photopolymerization of bovine hemoglobin entrapped nanoscale hydrogel particles within liposomal reactors for use as an artificial blood substitute. *Biomacromolecules*, 6(1), 414–424. <https://doi.org/10.1021/bm049432i>
- Pidcoke, H. F., Delacruz, W., Herzig, M. C., Schaffer, B. S., Leazer, S. T., Fedyk, C. G., Montgomery, R. K., Prat, N. J., Parida, B. K., Aden, J. K., Scherer, M. R., Reddick, R. L., Shade, R. E., & Cap, A. P. (2022). Perfluorocarbons cause thrombocytopenia, changes in RBC morphology and death in a baboon model of systemic inflammation. *PLoS one*, 17(12), e0279694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279694>
- Prempeh, A.B.A., & Cheng, D.C.H. (2022). O-Raffinose Cross-Linked Human Hemoglobin (Hemolink): History, Clinical Trials and Lessons Learned. In: Liu H., Kaye A.D., Jahr J.S., editors. *Blood Substitutes and Oxygen Biotherapeutics*. Springer; Cham, Switzerland: 2022. pp. 305–312
- Priavalle, C., & De Angelo, J. (2022). Hemoximer: History, Pharmacology, Pre-Clinical Studies, Clinical Trials, and Lessons Learned. In: Liu H., Kaye A.D., Jahr J.S., editors. *Blood Substitutes and Oxygen Biotherapeutics*. Springer
- Rameez, S., Alost, H., & Palmer, A. F. (2008). Biocompatible and biodegradable polymersome encapsulated hemoglobin: a potential oxygen carrier. *Bioconjugate chemistry*, 19(5), 1025–1032. <https://doi.org/10.1021/bc700465v>
- Rhodes CE, Denault D, Varacallo M. Physiology, Oxygen Transport. [Updated 2022 Nov 14]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538336/>
- Riess J. G. (2005). Understanding the fundamentals of perfluorocarbons and perfluorocarbon emulsions relevant to *in vivo* oxygen delivery. *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology*, 33(1), 47–63. <https://doi.org/10.1081/bio-200046659>
- Riess J. G. (2006). Perfluorocarbon-based oxygen delivery. *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology*, 34(6), 567–580. <https://doi.org/10.1080/10731190600973824>

Romito, B., Romito, J., & Abuchowski, A. (2022). Blood Substitutes and Oxygen Biotherapeutics. Springer; Cham, Switzerland: 2022. Sanguinate: History and Clinical Evaluation of a Multimodal HBOCs; pp. 335–343

Rousselot, M., Delpy, E., Drieu La Rochelle, C., Lagente, V., Pirow, R., Rees, J. F., Hagege, A., Le Guen, D., Hourdez, S., & Zal, F. (2006). *Arenicola marina* extracellular hemoglobin: a new promising blood substitute. *Biotechnology journal*, 1(3), 333–345. <https://doi.org/10.1002/biot.200500049>

Sakai, H., Horinouchi, H., Tomiyama, K., Ikeda, E., Takeoka, S., Kobayashi, K., & Tsuchida, E. (2001). Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. *The American journal of pathology*, 159(3), 1079–1088. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61783-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61783-X)

Sakai, H., Kobayashi, N., Kure, T., Azuma, H. (2022). Potential Clinical Application of Hemoglobin Vesicles as an Artificial Oxygen Carrier and Carbon Monoxide Carrier. In: Liu H., Kaye A.D., Jahr J.S., editors. *Blood Substitutes and Oxygen Biotherapeutics*. Springer

Sakai, H., Sou, K., & Tsuchida, E. (2009). Hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier. *Methods in enzymology*, 465, 363–384. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)65019-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)65019-9).

Sarkar S. (2008). Artificial blood. *Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine*, 12(3), 140–144. <https://doi.org/10.4103/0972-5229.43685>

Scott, R. W., Wilson, O. M., & Crooks, R. M. (2005). Synthesis, characterization, and applications of dendrimer-encapsulated nanoparticles. *The journal of physical chemistry. B*, 109(2), 692–704. <https://doi.org/10.1021/jp0469665>

Seifried, E., & Mueller, M. M. (2011). The present and future of Transfusion Medicine. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*, 9(4), 371–376. <https://doi.org/10.2450/2011.0097-10>

Sen Gupta A. (2019). Hemoglobin-based Oxygen Carriers: Current State-of-the-art and Novel Molecules. *Shock (Augusta, Ga.)*, 52(1S Suppl. 1), 70–83. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001009>

Sharma, A., Arora, S., Grewal, P., Dhillon, V., Kumar, V. (2011). Recent innovations in delivery of artificial blood substitute: a review. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 3(2), 1–5

Sharma, S., Sharma, P., & Tyler, L. N. (2011). Transfusion of blood and blood products: indications and complications. *American family physician*, 83(6), 719–724

Sheng, Y., Yuan, Y., Liu, C., Tao, X., Shan, X., & Xu, F. (2009). *In vitro* macrophage uptake and *in vivo* biodistribution of PLA-PEG nanoparticles loaded with hemoglobin as blood substitutes: effect of PEG content. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 20(9), 1881–1891. <https://doi.org/10.1007/s10856-009-3746-9>

Shi, Q., Huang, Y., Chen, X., Wu, M., Sun, J., & Jing, X. (2009). Hemoglobin conjugated micelles based on triblock biodegradable polymers as artificial oxygen carriers. *Biomaterials*, 30(28), 5077–5085. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.05.082>

Simoni, J., Simoni, G., & Moeller, J. F. (2009). Intrinsic toxicity of hemoglobin: how to counteract it. *Artificial organs*, 33(2), 100–109. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2008.00693.x>

- Sloan, E. P., Koenigsberg, M., Gens, D., Cipolle, M., Runge, J., Mallory, M. N., & Rodman, G., Jr (1999). Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock: a randomized controlled efficacy trial. *JAMA*, 282(19), 1857–1864. <https://doi.org/10.1001/jama.282.19.1857>
- Smani Y. (2008). Hemospan: a hemoglobin-based oxygen carrier for potential use as a blood substitute and for the potential treatment of critical limb ischemia. *Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)*, 9(9), 1009–1019
- Sou, K., Klipper, R., Goins, B., Tsuchida, E., & Phillips, W. T. (2005). Circulation kinetics and organ distribution of Hb-vesicles developed as a red blood cell substitute. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 312(2), 702–709. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.074534>
- Sprung, J., Kindscher, J. D., Wahr, J. A., Levy, J. H., Monk, T. G., Moritz, M. W., & O'Hara, P. J. (2002). The use of bovine hemoglobin glutamer-250 (Hemopure) in surgical patients: results of a multicenter, randomized, single-blinded trial. *Anesthesia and analgesia*, 94(4). <https://doi.org/10.1097/0000539-200204000-00006>
- Stowell C. (2008). Blood substitutes: time for a deep breath. *Transfusion*, 48(4), 574–575. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.01675.x>
- Tam, S. C., Blumenstein, J., & Wong, J. T. (1976). Soluble dextran-hemoglobin complex as a potential blood substitute. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(6), 2128–2131. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.6.2128>
- Tam, S. C., Blumenstein, J., & Wong, J. T. (1978). Blood replacement in dogs by dextran-hemoglobin. *Canadian journal of biochemistry*, 56(10), 981–984. <https://doi.org/10.1139/o78-153>
- Tao, Z., & Ghoroghchian, P. P. (2014). Microparticle, nanoparticle, and stem cell-based oxygen carriers as advanced blood substitutes. *Trends in biotechnology*, 32(9), 466–473. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.05.001>
- Tappenden J. (2007). Artificial blood substitutes. *Journal of the Royal Army Medical Corps*, 153(1), 3–9. <https://doi.org/10.1136/jramc-153-01-02>
- Thomas T.G. (1878). The intravenous injection of milk as a substitute for the transfusion of blood. *New York State Journal of Medicine*, 47, 449-465
- Thomson, A., Farmer, S., Hofmann, A., Isbister, J., & Shander, A. (2009). Patient blood management – a new paradigm for transfusion medicine? *ISBT science series*, 4(n2), 423–435. <https://doi.org/10.1111/j.1751-2824.2009.01251.x>
- Thuillier, R., Dutheil, D., Trieu, M. T., Mallet, V., Allain, G., Rousselot, M., Denizot, M., Goujon, J. M., Zal, F., & Hauet, T. (2011). Supplementation with a new therapeutic oxygen carrier reduces chronic fibrosis and organ dysfunction in kidney static preservation. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 11(9), 1845–1860. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03614.x>
- Tsai, A. G., Intaglietta, M., Sakai, H., Delpy, E., La Rochelle, C. D., Rousselot, M., & Zal, F. (2012). Microcirculation and NO-CO studies of a natural extracellular hemoglobin developed for an oxygen therapeutic carrier. *Current drug discovery technologies*, 9(3), 166–172. <https://doi.org/10.2174/157016312802650814>



- Tsai, C. H., Fang, T. Y., Ho, N. T., & Ho, C. (2000). Novel recombinant hemoglobin, rHb (beta N108Q), with low oxygen affinity, high cooperativity, and stability against autoxidation. *Biochemistry*, 39(45), 13719–13729. <https://doi.org/10.1021/bi001116a>
- Twyman, L. J., & Ge, Y. (2006). Porphyrin cored hyperbranched polymers as heme protein models. *Chemical communications (Cambridge, England)*, (15), 1658–1660. <https://doi.org/10.1039/b600831n>
- Twyman, L. J., Ellis, A., & Gittins, P. J. (2012). Pyridine encapsulated hyperbranched polymers as mimetic models of haeme containing proteins, that also provide interesting and unusual porphyrin-ligand geometries. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 48(1), 154–156. <https://doi.org/10.1039/c1cc14396d>
- Usuba, A., Motoki, R., Ogata, Y., Suzuki, K., & Kamitani, T. (1995). Effect and safety of liposome-encapsulated hemoglobin neo red cells (NRCs) as a perfusate for total cardiopulmonary bypass. *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology*, 23(3), 337–346. <https://doi.org/10.3109/10731199509117950>
- Varnado, C. L., Mollan, T. L., Birukou, I., Smith, B. J., Henderson, D. P., & Olson, J. S. (2013). Development of recombinant hemoglobin-based oxygen carriers. *Antioxidants & redox signaling*, 18(17), 2314–2328. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4917>
- Vincent, J. L., Privalle, C. T., Singer, M., Lorente, J. A., Boehm, E., Meier-Hellmann, A., Darius, H., Ferrer, R., Sirvent, J. M., Marx, G., & DeAngelo, J. (2015). Multicenter, randomized, placebo-controlled phase III study of pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene in distributive shock (PHOENIX). *Critical care medicine*, 43(1), 57–64. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000554>
- Waeterschoot, J., Gosselé, W., Lemež, Š., & Casadevall I Solvas, X. (2024). Artificial cells for *in vivo* biomedical applications through red blood cell biomimicry. *Nature communications*, 15(1), 2504. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-46732-8>
- Warsaw-based project to develop artificial blood could deliver innovation on a global scale. [https://ec.europa.eu/regional\\_policy/en/projects/Poland/warsaw-based-project-to-develop-artificial-blood-could-deliver-innovation-on-a-global-scale](https://ec.europa.eu/regional_policy/en/projects/Poland/warsaw-based-project-to-develop-artificial-blood-could-deliver-innovation-on-a-global-scale)
- Waters, J.H., Lim, J.C., Blanckenberg, J.M., & Jahr, J.S. (2022). Blood Substitutes and Oxygen Biotherapeutics. Springer; Cham, Switzerland: 2022. HBOC-201: History, Clinical Trials, and Path Forward; pp. 353–360
- Winslow R. M. (1995). Blood substitutes – a moving target. *Nature medicine*, 1(11), 1212–1215. <https://doi.org/10.1038/nm1195-1212>
- Winslow R. M. (2002). Blood substitutes. *Current opinion in hematology*, 9(2), 146–151. <https://doi.org/10.1097/00062752-200203000-00011>
- Winslow R.M. (1992). The results of 62 large-volume hemoglobin infusions in man. Hemoglobin-Based Red Cell Substitutes. Johns Hopkins University Press
- Winslow R.M. (2006a).  $\alpha$ -Crosslinked hemoglobin. In: Winslow R.M., editor. *Blood Substitutes*. Academic Press
- Winslow R.M. (2006b). Hemoglobin modification. In: Winslow R.M., editor. *Blood Substitutes*. Academic Press

Wollocko, H., Wollocko, J., Jahr, J.S., & Steier, K. (2022). OxyVita: History, Studies, and Future. In: Liu H., Kaye A.D., Jahr J.S., editors. *Blood Substitutes and Oxygen Biotherapeutics*. Springer

Xu, F., Yuan, Y., Shan, X., Liu, C., Tao, X., Sheng, Y., & Zhou, H. (2009). Long-circulation of hemoglobin-loaded polymeric nanoparticles as oxygen carriers with modulated surface charges. *International journal of pharmaceutics*, 377(1-2), 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.05.015>

Xu, Y., Zheng, Y., Fan, J. S., & Yang, D. (2006). A new strategy for structure determination of large proteins in solution without deuteration. *Nature methods*, 3(11), 931–937. <https://doi.org/10.1038/nmeth938>

Yu, B., Bloch, K. D., & Zapol, W. M. (2009). Hemoglobin-based red blood cell substitutes and nitric oxide. *Trends in cardiovascular medicine*, 19(3), 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2009.06.004>

Zal, F., Delpy, E., Jahr, J.S. (2022). M101, the Hemoglobin from the Sea: History and Therapeutic Perspectives. In: Liu H., Kaye A.D., Jahr J.S., editors. *Blood Substitutes and Oxygen Biotherapeutics*. Springer

Zhang, X., Lin, Y., Xin, J., Zhang, Y., Yang, K., Luo, Y., & Wang, B. (2024). Red blood cells in biology and translational medicine: natural vehicle inspires new biomedical applications. *Theranostics*, 14(1), 220–248. <https://doi.org/10.7150/thno.87425>

Zhu, K., Wang, L., Xiao, Y., Zhang, X., You, G., Chen, Y., Wang, Q., Zhao, L., Zhou, H., & Chen, G. (2024). Nanomaterial-related hemoglobin-based oxygen carriers, with emphasis on liposome and nano-capsules, for biomedical applications: current status and future perspectives. *Journal of nanobiotechnology*, 22(1), 336. <https://doi.org/10.1186/s12951-024-02606-1>

Малгожата Градюк, Галина Ткаченко, Наталія Кургалюк

## ВИКЛИКИ ТА МОЖЛИВОСТІ ШТУЧНОЇ КРОВІ

### АНОТАЦІЯ

**Мета дослідження:** Метою цього дослідження є представлення сучасного стану наукових досліджень щодо штучної крові, її потенційних клінічних застосувань і майбутніх напрямків розвитку. Проблема нестачі донорської крові в банках крові та зростаючий попит на переливання становлять значний виклик для сучасної медицини. У зв'язку з цим вчені по всьому світу намагаються розробити ефективні замітники крові, які могли б виконувати функцію перенесення кисню в організмі та зменшити залежність від традиційних донорів. У роботі розглянуто різні стратегії синтезу штучної крові, з урахуванням досягнень у галузі біотехнологій, біомедичної інженерії та нанотехнологій. Особливу увагу приділено дослідженням носіїв гемоглобіну та синтетичних еритроцитів.

**Методологія.** Для отримання достовірної та комплексної інформації щодо розвитку заміників крові було проведено аналіз наукової літератури, що включав бази даних, такі як PubMed, Scopus, Web of Science та Google Scholar. Досліджувані джерела охоплювали наукові статті, звіти про клінічні випробування, систематичні огляди та повідомлення про новітні технології в галузі біомедичної інженерії. У роботі розглянуто різні типи заміників еритроцитів, зосереджуючись на гемоглобіні, отриманому з різних джерел (наприклад, рекомбінантний гемоглобін, гемоглобін безхребетних), синтетичних мікрочастинках, що імітують еритроцити, та сучасних носіях кисню. Особливу увагу приділено результатам клінічних досліджень, які містять інформацію про безпеку, ефективність і можливі обмеження цих технологій.

**Наукова новизна.** Ця стаття робить важливий внесок у розвиток знань про штучну кров, представляючи погляд на її потенціал та виклики, пов'язані з клінічним застосуванням. Висвітлено ключові питання, такі як ефективність заміників крові у порівнянні з натуральною людською кров'ю, їх біодоступність, стабільність та можливі побічні ефекти. Крім того, звернуто увагу на витрати на виробництво та рівень прийняття таких продуктів медичною спільнотою та пацієнтами. У роботі також підкреслено необхідність подальших досліджень і розробки інноваційних технологій, які можуть сприяти підвищенню доступності та безпеки штучної крові. Розглянуто можливі напрямки майбутніх досліджень, зокрема застосування нанотехнологій, біоінженерії та біоматеріалів для створення більш ефективних і безпечних заміників крові.

**Висновки.** Розвиток штучних заміників еритроцитів може стати проривом у невідкладній медицині та в ситуаціях, коли традиційні переливання крові є неможливими або ускладненими (наприклад, у бойових умовах, під час стихійних лих, у регіонах із обмеженим доступом до донорської крові). Незважаючи на багаторічні дослідження та технологічний прогрес, багато заміників крові стикаються з труднощами, пов'язаними з обмеженою стабільністю, потенційною токсичністю та здатністю ефективно транспортувати кисень. Існуючі продукти, що пройшли клінічні випробування, демонструють перспективні властивості, проте вони все ще далекі від повного заміщення натуральної крові. Результати досліджень свідчать про те, що подальша робота над удосконаленням штучної крові має зосереджуватися на підвищенні безпеки, збільшенні терміну зберігання та оптимізації витрат на виробництво. Перспективи у цій сфері є багатообіцяючими, а майбутні досягнення можуть докорінно змінити підходи до лікування пацієнтів, які потребують переливання крові, і сприяти покращенню доступу до медичної допомоги у всьому світі.

**Ключові слова:** штучна кров, кровозамінники, клінічне застосування, носії гемоглобіну, кисневі терапевтичні засоби, перфторуглеці, носії кисню на основі гемоглобіну

**Received:** 11.02.2025. **Accepted:** 02.03.2025. **Published:** 03.04.2025.

**Ви можете цитувати цю статтю так:**

Gradziuk M., Tkaczenko H., Kurhaluk N. Wyzwania i możliwości w tworzeniu sztucznej krwi. *Biota. Human. Technology*. 2025. №1. S. 59-93.

**Cite this article in APA style as:**

Gradziuk, M., Tkaczenko, H., & Kurhaluk, N. (2025). Challenges and opportunities in artificial blood. *Biota. Human. Technology*, 1, P. 59-93. (in Polish)

#### Information about the authors:

**Gradziuk M.** [*in Ukrainian: Градюк М.*] <sup>1</sup>, Graduate Student, email: [gosiagra@op.pl](mailto:gosiagra@op.pl)  
ORCID: 0009-0008-7064-5214

Institute of Biology, Pomeranian University in Słupsk  
22B Arciszewskiego Street, Słupsk, 76-200, Poland

**Tkaczenko H.** [*in Ukrainian: Ткаченко Г.*] <sup>1</sup>, Dr. of Biol. Sc., Prof., email: halina.tkaczenko@upsl.edu.pl  
ORCID: 0000-0003-3951-9005 Scopus-Author ID: 16032082200

Department of Zoology, Institute of Biology, Pomeranian University in Słupsk  
22B Arciszewskiego Street, Słupsk, 76-200, Poland

**Kurhaluk N.** [*in Ukrainian: Кургалюк Н.*] <sup>5</sup>, Dr. of Biol. Sc., Prof., email: natalia.kurhaluk@upsl.edu.pl  
ORCID: 0000-0002-4669-1092 Scopus-Author ID: 55520986600

Department of Animal Physiology, Institute of Biology, Pomeranian University in Słupsk  
22B Arciszewskiego Street, Słupsk, 76-200, Poland

<sup>1</sup> Study design, data collection, manuscript preparation.

<sup>2</sup> Study design, data collection, manuscript preparation, funds collection.

<sup>3</sup> Study design, data collection, manuscript preparation, funds collection.