

เลือดเทียม (Artificial Blood)

นศ.ธีรวิศรา ตันเจริญลาภ¹ และ ภก.นรินทร์ กิจเกรียงไกรกุล²

¹ นักศึกษาฝึกปฏิบัติงานวิชาชีวเภสัชศาสตร์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ปี 2560

² ฝ่ายผลิตตุ้งบรรจุโลหิต อุปกรณ์และน้ำยา ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทนำ

ในปี ค.ศ. 1980 มีการแพร่ระบาดของเชื้อ HIV เป็นอย่างมาก การศึกษาเกี่ยวกับเลือดเทียม จึงเริ่มเป็นที่สนใจมากขึ้น เนื่องจากความเสี่ยงในการติดต่อของโรคผ่านการถ่ายเลือด¹ ทำให้ต้องการตรวจคัดกรองหาเชื้อในเลือดซึ่งมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังพบปัญหาอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น การมีปริมาณเลือดสำรองไม่เพียงพอ โดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนา ความต้องการเลือดที่เพิ่มมากขึ้น อายุการเก็บรักษาเลือดที่สั้นตามธรรมชาติ การก้าวเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุในโลกปัจจุบันทำให้จำนวนผู้บริจาคเลือดลดลง ความต้องการเลือดเร่งด่วนในบางสถานการณ์ เช่น ภาวะสงคราม หรือเมื่อเกิดภัยพิบัติ เป็นต้น² จากปัญหาดังกล่าวข้างต้น ปัจจัยที่มีความสำคัญมากที่สุดคือเรื่องความปลอดภัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการแพร่ระบาดของโรคติดต่อชนิดใหม่ๆ เช่น Ebola และ H1N1 ซึ่งการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อคัดกรองโรคเหล่านี้เป็นเรื่องที่มีค่าใช้จ่ายสูง³

การออกแบบเลือดเทียมที่จะนำมาใช้ทดแทนเลือดจริงต้องให้มีความทำงานที่คล้ายกับเลือดตามธรรมชาติในร่างกายมนุษย์⁴ โดยการพัฒนาส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่การเลียนแบบหน้าที่การขนส่งออกซิเจนของเลือด ในบทความนี้จะให้ความสนใจเกี่ยวกับสารที่จะนำมาใช้ทดแทนเลือดที่มีการเลียนแบบหน้าที่ในการขนส่งออกซิเจน รวมถึงอุปสรรคต่างๆ ต่อการที่จะนำผลิตภัณฑ์เหล่านี้มาใช้ในมนุษย์ได้จริง

ความเป็นมาของเลือดเทียม⁵

ปี ค.ศ. 1616 William Harvey ค้นพบการไหลเวียนของเลือดภายในร่างกาย ในปีต่อๆ มา มีแพทย์ฝึกหัดได้ทดลองนำสารต่างๆ ได้แก่ เปียร์ ปัสสาวะ นม เรซินของพืช และเลือดแกะมาใช้ทดแทนเลือด โดยพวกเขามีความหวังว่าการเปลี่ยนถ่ายเลือดจะเกิดประโยชน์ต่างๆ เช่น สามารถรักษาโรค หรือแม้กระทั่งเปลี่ยนบุคลิกภาพ การถ่ายเลือดที่ประสบความสำเร็จเกิดขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1667 แต่เป็นที่น่าเสียดายที่การศึกษาด้านนี้หยุดชะงักลงเนื่องจากผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนถ่ายเลือดเสียชีวิต ในบรรดาวัตถุดิบที่หลากหลายที่มีการนำมาใช้ทดแทนเลือดมีเพียงไม่กี่ชนิดที่ประสบความสำเร็จเล็กน้อยซึ่งนมเป็นหนึ่งในชนิดในนั้น ปี ค.ศ. 1854 ผู้ป่วยได้รับการฉีดยาเข้าสู่ร่างกายเพื่อรักษาอหิวาตกโรค (Asiatic cholera) โดยแพทย์มีความเชื่อว่านมสามารถช่วยในการสร้างเม็ดเลือดขาวได้ และพบว่าผู้ป่วยที่ได้รับนมเข้าไปเพื่อทดแทนเลือดมีอาการที่ดีขึ้นจึงมีการสรุปว่านมมีความปลอดภัย อย่างไรก็ตามแพทย์จำนวนมากยังคงไม่ยอมรับข้อสรุปนี้ ดังนั้นการฉีดยาเข้าสู่ร่างกายจึงไม่พบการใช้อย่างกว้างขวางและถูกลืมไปในที่สุด

สารอื่นๆ ที่มีศักยภาพในการใช้เป็นสารทดแทนเลือด ได้แก่ เกลือและน้ำเกลือ โดยจากการทดลองที่ทำในกบ นักวิทยาศาสตร์พบว่าพวกเขาสามารถทำให้กบมีชีวิตอยู่ต่อไปได้ในบางครั้งจากการนำเลือดทั้งหมดออกจากตัวกบและทดแทนเลือดที่หายไปด้วยน้ำเกลือ อย่างไรก็ตาม ผลสรุปของการทดลองนี้เกิดจากความเข้าใจผิดเนื่องจากตามปกติกบสามารถมีชีวิตรอดในภาวะที่

ไม่มีการไหลเวียนโลหิตเลยได้ในระยะเวลาสั้นๆ ต่อมาภายหลังได้มีการศึกษามากขึ้น น้ำเกลือจึงถูกพัฒนาเพื่อใช้เป็นสารเพิ่มปริมาณพลาสมา (plasma volume expander)

วัตถุดิบอื่นๆ ที่มีการทดลองนำมาใช้ในช่วงปี ค.ศ. 1800-1809 ประกอบด้วยฮีโมโกลบิน (hemoglobin) และพลาสมาของสัตว์ ในปี ค.ศ. 1868 นักวิจัยพบว่าสารละลายที่ประกอบด้วยฮีโมโกลบินที่แยกจากเม็ดเลือดแดงสามารถใช้เป็นสารทดแทนเลือดได้ ในปี ค.ศ. 1871 พวกเขาได้ทำการทดสอบโดยใช้เลือดและพลาสมาของสัตว์เพื่อทดแทนเลือดของมนุษย์ แต่ทั้งสองวิธีถูกขัดขวางจากปัญหาความก้าวหน้าของเทคโนโลยีช่วงศตวรรษที่ 19 อยู่ 2 ประการ ประการแรก คือนักวิทยาศาสตร์พบว่าเป็นการยากที่จะแยกฮีโมโกลบินจำนวนมากออกจากเลือด ประการที่สอง ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ประกอบด้วยสารต่างๆ จำนวนมากซึ่งอาจเป็นพิษต่อมนุษย์และการกำจัดสารพิษเหล่านั้นออกถือเป็นเรื่องยาก

การกำเนิด Ringer's solution ซึ่งเป็นสารละลายที่ประกอบด้วย โซเดียม โปแทสเซียม และแคลเซียม ในปี ค.ศ. 1883 ถือเป็นจุดเปลี่ยนสำคัญในการพัฒนาเลือดเทียม โดยนักวิจัยพบว่าหัวใจของกบที่ทดลองสามารถที่จะเต้นต่อไปได้เมื่อมีการให้สารละลายชนิดนี้เข้าไป จึงนำไปสู่การค้นพบว่า การที่ความดันเลือดตกจากการสูญเสียเลือดนั้นสามารถแก้ไขให้กลับสู่ภาวะปกติได้โดยการใช้ Ringer's solution ปัจจุบันแม้ว่าจะมีการใช้สารนี้เพื่อเป็นสารเพิ่มปริมาณเลือด (blood volume expander) แต่จากการที่สารนี้ไม่สามารถทดแทนการทำหน้าที่ของเม็ดเลือดแดงได้จึงไม่ถือว่าเป็นสารทดแทนเลือดที่แท้จริง

Karl Landsteiner บิดาแห่งภูมิคุ้มกันวิทยา (immunology) เชื่อว่าสารชีวเคมีในเลือดมีทั้งความคล้ายคลึงกันและความแตกต่างกัน เนื่องจากพบว่าไม่ใช่ทุกครั้งที่การถ่ายเลือดจะเกิดการตกตะกอนของเลือดขึ้น เขาได้ทำการทดลองและสรุปว่าเลือดของมนุษย์สามารถแบ่งออกเป็นหมู่

เลือดต่างๆ ได้แก่ A, B, O ตามความสามารถของเม็ดเลือดแดงที่ตกตะกอนในซีรัม (serum) ที่แตกต่างกัน ส่วนหมู่เลือด AB นั้นถูกค้นพบในปีต่อมา การค้นพบของเขาทำให้ผู้ป่วยและผู้ให้เลือดทราบหมู่เลือดของตนก่อนการเปลี่ยนถ่ายเลือด ส่งผลให้การเปลี่ยนถ่ายเลือดมีความปลอดภัยมากยิ่งขึ้น ซึ่งทำให้ Karl ได้รับรางวัลโนเบลในสาขาสรีรวิทยาและการแพทย์ในปี ค.ศ. 1930

การวิจัยเกี่ยวกับการเปลี่ยนถ่ายเลือดยังไม่มี การพัฒนาไปมากนักจนกระทั่งนักวิทยาศาสตร์มีความเข้าใจที่ดีขึ้นเกี่ยวกับหน้าที่ของเลือด ในระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 1 สารละลาย gum-saline ซึ่งประกอบด้วย galactoso-gluconic acid ถูกนำมาใช้เพื่อช่วยให้ใช้ปริมาณพลาสมาลดลง ในช่วงปี ค.ศ. 1920-1929 มิงงานวิจัยที่ชี้ให้เห็นว่าการใช้ gum-saline มีผลทางลบบางอย่างต่อสุขภาพ ต่อมาระหว่างปี ค.ศ. 1930-1939 มีการใช้สารละลายชนิดนี้ลดลง แต่เมื่อเกิดสงครามโลกครั้งที่ 2 ได้เกิดความสนใจในการวิจัยเกี่ยวกับเลือดและสารทดแทนเลือดขึ้นอีกครั้ง โดยในปี ค.ศ. 1947 ได้มีการก่อตั้งธนาคารเลือดขึ้น โดยหน่วยงาน American Red Cross

ปี ค.ศ. 1966 การทดลองในหนูพบสารที่สามารถใช้ทดแทนเลือดชนิดใหม่ คือ perfluorochemicals (PFC) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ (polymer) สายยาวคล้าย Teflon โดยพบว่าหนู mice มีชีวิตรอดหลังได้รับ PFC ต่อมาในปี ค.ศ. 1968 มีการทดสอบสาร PFC ในหนู rat โดยนำเลือดของหนู rat ทั้งหมดออกและให้ PFC emulsion เข้าไปแทน พบว่าหนูสามารถมีชีวิตอยู่ต่อได้อีกไม่กี่ชั่วโมง แต่จะฟื้นตัวเต็มที่เมื่อมีการให้เลือดของมันกลับมาแทนที่ นักวิทยาศาสตร์จึงได้เริ่มมองหาสารละลายฮีโมโกลบินและสารสังเคราะห์ที่จะสามารถทำหน้าที่เป็นตัวขนส่งออกซิเจน (synthetic oxygen carrier) ได้

ปี ค.ศ. 1989 FDA (Food and Drug Administration) ได้รับรองสารที่ทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนแทนเลือดในกลุ่ม Perfluorocarbon

(Perfluorocarbon based product) ซึ่งมีชื่อเรียกว่า Fluosol-DA-20 เป็นครั้งแรก

ปี ค.ศ. 1990 Haemopure ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของฮีโมโกลบิน ทำหน้าที่ขนส่งออกซิเจนแทนเลือดใน (Hemoglobin based oxygen carrier) ได้รับการรับรองการทดลองทางคลินิกในระยะที่ 3

เดือนธันวาคม ปี ค.ศ. 2003 มีการนำเสนอ Polyheme ซึ่งเป็นสารกลุ่ม Hemoglobin based oxygen carrier

คุณสมบัติของเลือดเทียมในอุดมคติ⁶

1. มีความปลอดภัยในการนำมาใช้
2. มีความเข้ากันได้กับร่างกายมนุษย์
3. สามารถขนส่งออกซิเจนและปลดปล่อยออกซิเจนให้ร่างกายส่วนที่ต้องการได้
4. ปราศจากเชื้อโรคและสารพิษ ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกายมนุษย์
5. สารทดแทนเลือดหรือเลือดสังเคราะห์ต้องมีความสามารถในการขนส่งออกซิเจนได้เทียบเท่าหรือมากกว่าเลือดตามธรรมชาติ
6. สามารถเข้าถึงได้ง่ายเทียบเท่าเลือดจากการบริจาคหรือง่ายกว่า
7. สามารถเข้ากันได้กับเลือดทุกหมู่เพื่อลดการทำ cross matching และมีผลข้างเคียงต่อผู้รับเลือดน้อยที่สุด
8. สามารถเก็บได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง
9. มีอายุการใช้งานได้นานและมีความเหมาะสมในด้านราคา

สารที่ใช้ทดแทนเลือด

สารทดแทนเลือด สามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่มหลักตามความแตกต่างในการขนส่งออกซิเจน ได้แก่ Perfluorochemical-based RBC substitutes และ Hemoglobin based RBC substitutes

1. Perfluorochemicals (PFCs)

ในปี ค.ศ. 1966 Clark และคณะ ค้นพบความสามารถในการขนส่งออกซิเจนของ PFCs ซึ่งประกอบด้วยคุณสมบัติขั้นพื้นฐานของ PFCs คือ เป็นของเหลวที่มีจุดเดือดต่ำ ไม่ละลายในน้ำและแอลกอฮอล์ ไร้สี ไม่มีพิษ และมีความเฉื่อย จากการที่อะตอมไฮโดรเจนถูกแทนที่ด้วยฟลูออรีนทำให้สารนี้ไม่ถูก metabolite เนื่องจากพันธะระหว่างคาร์บอนและฟลูออรีนมีความแข็งแรง โดยมีสูตรเคมีคือ C_nF_{2n+2} ⁷

อย่างไรก็ตาม สารนี้มีข้อจำกัดอยู่สองประการที่ต้องได้รับการปรับปรุงแก้ไขคือ 1. สารนี้ไม่สามารถละลายน้ำ ดังนั้นหากต้องการใช้งานจึงต้องมีการเติมสาร emulsifier⁸ 2. PFCs มีความสามารถในการขนส่งออกซิเจนน้อยกว่ากลุ่ม hemoglobin based product นั้นหมายความว่าต้องใช้ปริมาณ PFCs มากกว่าในการขนส่งออกซิเจนในปริมาณที่เท่าๆ กัน

ข้อดีหลักๆ ของ PFCs คือ สามารถใช้กับผู้ป่วยที่ร่างกายต่อต้านเลือดหรือโปรตีนที่ได้จากมนุษย์หรือสัตว์⁹ ทนต่อความร้อน (heat resistant) โดยสามารถทนได้ถึง 300 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงง่ายต่อการทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ความร้อน³ นอกจากนี้ด้วยขนาดที่เล็กทำให้สามารถเข้าถึงบริเวณที่มีหลอดเลือดตีบได้ดีกว่าเม็ดเลือดแดงปกติ ซึ่งจากการทดลองแบบ in vitro แสดงให้เห็นว่าการใช้ PFCs เป็นเลือดเทียมมีประโยชน์ต่อผู้ป่วยที่มีภาวะหลอดเลือดแดงหัวใจตีบตันเพื่อประคับประคองการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ¹⁰ รวมถึงยังเป็นสารเพิ่มปริมาณเลือดในระหว่างทำการผ่าตัดหรือภาวะหมดสติจากการสูญเสียเลือดด้วย¹¹

Fluosol-DA เป็นสารตัวแรกในกลุ่ม PFCs ที่ได้รับการรับรอง โดยความสามารถในการขนส่งออกซิเจนของสารตัวนี้ต่ำกว่าในเม็ดเลือดแดง¹² นอกจากนี้ อาจก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อน เช่น pulmonary reaction ซึ่งสามารถแก้ไขโดยการ

ให้ steroid แบบฉีดร่วมด้วย¹³ ดังนั้นการศึกษาทางคลินิกของ Fluosol-DA จึงหยุดไป

ผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น OxyFlourTM และ OxygentTM เป็นผลิตภัณฑ์รุ่นที่สองของกลุ่มนี้ซึ่งถูกระงับการศึกษาทางคลินิกเนื่องจากพบการเกิดอาการข้างเคียง เช่น เพิ่มความเสี่ยงในการเป็น stroke²

2. Hemoglobin based RBC substitutes

ฮีโมโกลบินของมนุษย์ได้มาจากหลายแหล่งซึ่งเม็ดเลือดแดงที่หมดอายุในถุงเก็บ (expired RBC bags) ถือเป็นแหล่งใหญ่ ส่วนแหล่งอื่นๆ นั้น ได้แก่ cord blood RBC, เลือดจากสัตว์ (วัว) และ recombinant hemoglobin

การติดต่อของเชื้อโรคถือเป็นสิ่งที่น่าที่กังวลเมื่อแหล่งที่มาของเลือดมาจากมนุษย์หรือสัตว์ จะเห็นว่าการตรวจประเมินความเสี่ยงของ bovine spongiform encephalitis (BSE) นั้นมีความสำคัญมาก อย่างไรก็ตามฮีโมโกลบินจากสัตว์มีข้อดีหลายอย่างที่เหนือกว่าฮีโมโกลบินจากมนุษย์ ซึ่งได้แก่ ความง่ายในการเข้าถึง ความต้านทานต่อการเสื่อมสภาพของฮีโม (heme) การใช้ chloride แทน 2,3-DPG ในการเป็น allosteric effector¹⁴

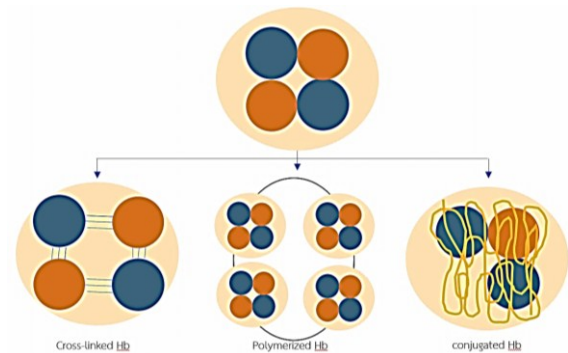
นอกจากนี้ การผลิต genetically modified Hb ในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กและพืชก็เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่สามารถแก้ปัญหาต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตผลิตภัณฑ์นี้ได้ ยิ่งไปกว่านั้นวิธีนี้ยังสามารถลดผลข้างเคียงของผลิตภัณฑ์ได้ด้วย ตัวอย่างเช่นสามารถเพิ่มความสามารถในการจับ (affinity) ของฮีโมโกลบินต่อไนตริกออกไซด์ (NO) และออกซิเจน¹⁵ ในปี ค.ศ. 1990 Hoffman และคณะได้ทำการผลิต recombinant Hb ในสเกลใหญ่ได้สำเร็จโดยใช้ *E.coli*¹⁶

ค่าครึ่งชีวิต (half-life) ของฮีโมโกลบินเมื่ออยู่ในภายในและภายนอกเม็ดเลือดแดงนั้นไม่มีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม พบว่า tetramer molecule ของฮีโมโกลบินจะถูกเปลี่ยนเป็น dimer และ monomer hemoglobin ได้เร็วกว่า

ส่งผลให้เกิดโรคแทรกซ้อนรุนแรง เช่น ไตถูกทำลาย นอกจากนี้การที่ฮีโมโกลบิน และ 2,3-DPG แยกออกจากกันทำให้ความสามารถในการจับกับออกซิเจนเพิ่มขึ้น^{2,9} ในทางกลับกันฮีโมโกลบินทำลาย NO ที่มีอยู่เป็นผลให้หลอดเลือดเกิดการหดตัว (vasoconstriction)

Hb-based oxygen carriers (HBOCs) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ Acellular HBOCs และ Cellular HBOCs

2.1 Acellular HBOCs ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของฮีโมโกลบินและลดผลข้างเคียง (ตารางที่ 1) โดยสามารถแบ่งกลุ่มย่อยออกได้อีกเป็น 3 กลุ่ม ประกอบด้วย cross-linked HBOCs, polymerized HBOCs และ conjugated HBOCs (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 Acellular HBOCs แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อยตามลักษณะการปรับปรุงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงาน ได้แก่ 1. Cross-linked Hb ระหว่างโมเลกุลฮีโมโกลบินเชื่อมกันด้วยพันธะโควาเลนต์ 2. Polymerized type ระหว่างกลุ่มของฮีโมโกลบินมีการเชื่อมกันด้วยพันธะโควาเลนต์ 3. Conjugated Hb มีพอลิเมอร์ติดอยู่ที่ผิวของฮีโมโกลบิน

อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ที่ถูกผลิตขึ้นมามีเพียง nanotechnology-based polyhemoglobin (PolyHb) และ conjugated Hb ที่มีประสิทธิภาพ¹⁸ แต่เนื่องจากการมีค่าครึ่งชีวิตที่ค่อนข้างสั้น รวมถึงผลข้างเคียงที่เกิดซึ่งล้วนเป็นปัจจัยที่ทำให้ผลิตภัณฑ์ไม่ผ่านข้อกำหนดของการศึกษาทางคลินิก โดยปัญหาหลักที่เป็นข้อจำกัดของผลิตภัณฑ์คือไม่สามารถเปลี่ยน Fe³⁺ ไปเป็น

Fe²⁺ ซึ่งเป็นหน้าที่สำคัญของเม็ดเลือดแดง ต่อมา จึงมีการนำ reducing agent มาต่อเข้ากับผิวของ

ฮีโมโกลบินเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว²

ตารางที่ 1 ภาพรวมของผลิตภัณฑ์ในกลุ่ม acellular Hb-based oxygen carriers²²

TYPE OF HBOC	PRODUCT	BIOGENESIS	ACTION	PROPERTIES
Cross-linked HBOC	Diaspirin cross-linked Hb (DCLHb) or HemAssist	Human hemoglobin	Carrier of oxygen	In phase III clinical trial, it seems to increase mortality rates (6), lacking the ability to outregulate the oxidative state of iron in their heme group (4)
Polymerized HBOC	Hemopure	Glutaraldehyde bovine Hb	Carrier of oxygen	Lacking the ability to outregulate the oxidative state of iron in their heme group (4), contains higher amount of free $\alpha\beta_2$, increases the risk of cardiovascular problems, risk of transmission of diseases due to the use of bovine hemoglobin (6)
	PolyHeme	Glutaraldehyde, pyridoxal human Hb	Carrier of oxygen	Increasing the risk of cardiovascular problems (6), trauma victims (6)
	Oxyglobin	Bovine hemoglobin	Carrier of oxygen	Lacking the ability to outregulate the oxidative state of iron in their heme group (4), risk of transmission of diseases due to the use of bovine hemoglobin (6)
	PolyHb-SOD-CAT-CA	Bovine hemoglobin	Carrier of oxygen, removal of oxygen radical, transportation of CO ₂	Risk of transmission of diseases due to the use of bovine hemoglobin (6)
	PolyHb-Fibrinogen		Carrier of oxygen and coagulation	Lacking the ability to outregulate the oxidative state of iron in their heme group (4)
Conjugated HBOC	Hemospan	Maleimide PEG-human Hb	Carrier of oxygen	Lacking the ability to outregulate the oxidative state of iron in their heme group (4)
	MP4	Maleimide PEG-hemoglobin	Carrier of oxygen	

2.1.1 Cross-linked HBOCs²² เป็นการปรับปรุงโดยการยึดเหนี่ยวภายในโมเลกุลด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent) ทำให้ไม่เกิดการแยกจากกันของฮีโมโกลบิน ผลิตภัณฑ์ในกลุ่มนี้ได้แก่ Diaspirin cross-linked Hb หรือ HemAssist ซึ่งถูกนำไปใช้ในหลายวัตถุประสงค์ เช่น การลด neurological damage ในหนู mouse¹⁹, intraoperative anemia ในแกะ²⁰, cardiopulmonary resuscitation ในหมู²¹

2.1.2 Polymerized HBOCs เป็นการปรับปรุงโดยการยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลเพื่อให้โมเลกุลมีขนาดใหญ่ขึ้น โดยแต่ละ PolyHb ประกอบด้วยฮีโมโกลบิน 4-5 โมเลกุล โดยผลิตภัณฑ์กลุ่มนี้มีหลายชนิด เช่น

- Hemopure ปัจจุบันอยู่ในขั้นตอนการศึกษาทางคลินิกระยะที่ 3

- PolyHeme ปัจจุบันถูกถอนโดย US FDA แล้วเนื่องจากผลข้างเคียงของผลิตภัณฑ์

- Oxyglobin เป็นผลิตภัณฑ์ตัวแรกที่ได้รับการรับรองจาก US FDA และ European Commission เพื่อใช้สำหรับสัตว์

- PolyHb-SOD-CAT-CA RBC ถูกคิดค้นขึ้นโดย Bian และ Chang ซึ่งสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องได้นาน 320 วัน อีกทั้งเมื่ออยู่ในรูปแบบ lyophilize ยังสามารถทำให้ปราศจากเชื้อ (sterilized) ได้

- PolyHb-fibrinogen นอกเหนือจากคุณสมบัติในการขนส่งออกซิเจนยังทำหน้าที่เป็น coagulant จึงถูกนำมาใช้ในกรณีที่เกี่ยวข้องเลือด²³

2.1.3 Conjugated HBOCs เป็นการปรับปรุงโดยการนำพอลิเมอร์มาต่อเข้ากับผิวหน้าของโมเลกุลฮีโมโกลบิน โดยส่วนมาก polyethylene-glycol (PEG) มักถูกเลือกมาใช้เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำและไม่กระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย²⁴ โดยผลิตภัณฑ์ในกลุ่มนี้ได้แก่

- Hemospan อยู่ในระหว่างการศึกษาทางคลินิก

- MP4 อยู่ในระหว่างการศึกษาทางคลินิกในมนุษย์²⁵ ซึ่งผลิตภัณฑ์นี้ไม่ส่งผลให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด

นอกเหนือจาก PEG ยังมีพอลิเมอร์ชนิดอื่นๆ ที่มีการนำมาใช้ ได้แก่ benzene

tetracarboxylate dextran²⁶, hydroxyethyl starch²⁷ และ albumin²⁸

Recombinant Hb เนื่องจากฮีโมโกลบินสามารถทำงานได้ดีที่สุดเมื่ออยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดง ดังนั้นการที่จะใช้ฮีโมโกลบินในรูปแบบที่ไม่อยู่ในเซลล์เม็ดเลือดแดงจึงต้องมีการปรับปรุงหลายสิ่งเพื่อเพิ่มค่าครึ่งชีวิตในระบบหมุนเวียนเลือดดังที่ได้กล่าวไว้ใน 3 กรณีข้างต้นและป้องกันการเกิดโรคแทรกซ้อนในร่างกาย ซึ่งการผลิตฮีโมโกลบินโดยวิธี recombinant นั้นเป็นการปรับปรุงอีกวิธีหนึ่งที่เป็นเรื่องง่ายโดยการทำ directed mutagenesis²⁹ การศึกษาส่วนใหญ่ให้ความสนใจในการใช้ *E.coli* แต่ host อื่นๆ เช่น แบคทีเรีย หมูและหนูที่ผ่านการตัดต่อพันธุกรรมก็สามารถนำมาใช้ได้เช่นกัน³⁰ อย่างไรก็ตามข้อจำกัดที่สำคัญในการผลิตโดยอาศัยวิธีนี้คือ yield ของฮีโมโกลบินที่ผลิตได้ค่อนข้างต่ำ ค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิตสูง อีกทั้งการทำให้ความบริสุทธิ์ถึงระดับที่ต้องการก็เป็นเรื่องยาก^{29, 30} ต่อมาความพยายามในการทำให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นโดยใช้หลักการเพิ่มการแสดงออกของตัวขนส่งฮีเม (heme transporter) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย³¹ นอกจากนี้ยังมีการใช้หลักการ targeted mutation ซึ่งทำให้คุณสมบัติต่างๆ ของฮีโมโกลบินดีขึ้น เช่น เพิ่มความชอบจับกับออกซิเจน ลดการทำลาย NO และลดการเกิด autooxidation เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม ในสหรัฐอเมริกายังไม่มีการผลิตฮีโมโกลบินตัวใดที่ได้รับใบอนุญาตเพื่อใช้ในการรักษา³⁰

2.2 Cellular HBOCs คือกลุ่มผลิตภัณฑ์ฮีโมโกลบินที่ถูกบรรจุอยู่ในโครงสร้างที่คล้ายเซลล์ ซึ่งกรณีนี้บางผลิตภัณฑ์มีความคล้ายคลึงกับเม็ดเลือดแดงมาก จึงไม่ส่งผลให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือดที่เป็นผลมาจากการทำลาย NO ภาพรวมของผลิตภัณฑ์กลุ่มนี้แสดงในตารางที่ 2

การหุ้มฮีโมโกลบินด้วย phospholipid layer (liposome encapsulated Hb [LEH]) ช่วยให้ค่าครึ่งชีวิตและอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ยาวขึ้นเทียบกับชนิด acellular HBOCs นอกจากนี้ LEH ยังมีขนาดอนุภาคที่เล็กกว่าเม็ดเลือดแดงในสัดส่วน 1:30 ซึ่งขนาดที่เล็กนี้ส่งผลให้สามารถเข้าถึงบริเวณต่างๆ ของร่างกายที่เม็ดเลือดแดงไม่สามารถเข้าถึงได้ เช่น บริเวณที่เกิดการอุดตันของหลอดเลือด เป็นต้น²² อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์นี้ยังถือว่ามีความปลอดภัยที่สั้น แต่สามารถแก้ไขได้โดยการต่อ PEG เข้าที่ผิวของอนุภาค¹

ผลิตภัณฑ์ต่างๆ ในกลุ่มนี้ ได้แก่

- Neo red cell ที่มีความสามารถในการขนส่งออกซิเจนสูงกว่าเม็ดเลือดแดง³²
- Hb vesicle ซึ่งมีค่าครึ่งชีวิตในเลือดนานขึ้นและถูกต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายน้อยกว่า^{33,34}
- LEAChb เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการพัฒนาให้มีการห่อหุ้มที่แข็งแรงขึ้นทำให้ค่าครึ่งชีวิตสูงขึ้นเนื่องจากสาเหตุที่ค่าครึ่งชีวิตของฮีโมโกลบินในเลือดสั้นนั้นมาจาก 2 ปัจจัยคือ (1) ถูกกำจัดโดยระบบไต และ (2) LEH ที่หุ้มรอบถูกทำลายในกระแสเลือด²³
- HbPNP จัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถย่อยได้ในร่างกาย (biodegradable) ซึ่งปัญหาสำคัญของผลิตภัณฑ์ตัวนี้คือถูกกำจัดอย่างรวดเร็วโดย phagocyte
- Cationized HbPNPs จึงเป็นผลิตภัณฑ์ตัวถัดมาที่ถูกผลิตขึ้นเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว เนื่องจากกรณีที่ผิวเป็นประจุบวกจะช่วยให้ค่าครึ่งชีวิตยาวนานขึ้น³⁵
- Fe(II)porphyrin-loaded dendrimers เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีรูปร่างและขนาดที่คล้ายคลึงกับฮีโมโกลบินและสามารถขนส่งออกซิเจนได้ อย่างไรก็ตามการผลิตต้องใช้เวลาและค่าใช้จ่ายมาก²²
- PEG-PLA ซึ่งมีค่าครึ่งชีวิตที่นานขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มก่อนหน้านี้

- NHPs และ Lipogel เป็นกลุ่มที่ใช้สารตั้งต้นอื่นในการเป็นสารหุ้มรอบฮีโมโกลบิน โดย NHPs ใช้สารหุ้มรอบที่มีคุณสมบัติเป็นสารที่ไม่สามารถย่อยสลายภายในร่างกายได้ (nonbiodegradable) แต่มีความเข้ากันได้กับร่างกาย (biocompatible) เนื่องจากมีการวิจัยก่อนหน้าพบว่าโรคแทรกซ้อนหลายโรคเกิดจาก

การเสื่อมสภาพของพอลิเมอร์ชนิดที่สามารถย่อยสลายได้ภายในร่างกาย (biodegradable) ที่ถูกนำมาใช้เป็นสารหุ้มรอบ ส่วน Lipogels คือรูปแบบที่ NHPs ถูกหุ้มรอบอีกครั้งด้วย lipid bilayer ซึ่งส่งผลให้ความแข็งแรงเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งยังทำให้มี Hb-loading capacity ที่สูงขึ้นและถูกจดจำด้วยไตน้อยลง³⁶

ตารางที่ 2 ภาพรวมของผลิตภัณฑ์ในกลุ่ม cellular Hb-based oxygen carriers²²

PRODUCT	BIOGENESIS	ACTION	PROPERTIES
Neo red cell	Hemoglobin	Carrier of oxygen	High oxygen transport efficiency, has a strong capsule membrane, readily circulates due to its low viscosity (48)
Hemoglobin vesicle (HbV)	Carbonyl human hemoglobin	Carrier of oxygen	Transient decrease in phagocytic activity one day after infusion (49), cause splenomegaly (49), higher encapsulation efficiency (50). The advantages of HbV over the conventional Hb vesicles are also the surface modification of HbV with poly(ethylene glycol) that allows better hemodynamics, reduced complement activation and longer circulation time and a moderate rate of entrapment and metabolism (49)
Liposome encapsulated actin-hemoglobin (LEAChb)	Bovine hemoglobin	Carrier of oxygen	High circulation half-life, disk like shape (35)
Hemoglobin-loaded polymeric nanocapsule (PNP)	Hemoglobin	Carrier of oxygen	Rapid clearance by phagocytosis in blood stream, high encapsulation efficiency, biocompatible in a large concentration range (51)
Cationized HbPNP	Bovine hemoglobin	Carrier of oxygen	High half-life in circulation in comparison to PNP due to low uptake by macrophages, no significant aggregation and sedimentation even after 5 days, biocompatibility and biofunctionality, high encapsulation efficiency, controlled particle size, biocompatible in a large concentration range, lack of cytotoxicity (51)
Fe(II) porphyrin loaded dendrimer	Porphyrin	Carrier of oxygen, efficient oxidation catalyst	The shape and size of this product is similar to RBCs, production of this product is time consuming and costly (53)
Nanocapsule bearing a membrane made of ultrathin PEG-PLA, containing polymerized Hb and all RBC enzymes	Hemoglobin	Carrier of oxygen, all other action of RBC	Containing all RBC enzymes specially reductase (56), high half-life due to reduced phagocytosis (57)
Nanoscale hydrogel particles (NHP)	Bovine hemoglobin	Carrier of oxygen	Releases hemoglobin to blood stream, good oxygen uptake and release characteristics (58)
Lipogel	Bovine hemoglobin	Carrier of oxygen	High hemoglobin loading capacity, low recognition by immune cells, good oxygen uptake and release (58)
Polymersome-encapsulated hemoglobin (PEH)	Human and bovine hemoglobin	Carrier of oxygen, drug delivery in cancer (polymersome encapsulated drug)	High Hb loading capacity even higher than lipogel and NHP (59), can be prepared in large quantities, affinity to oxygen, comparable to human RBC, size distribution, Hb encapsulation efficiency, oxygen affinity (P50), cooperativity coefficient, and methemoglobin (metHb) level of these novel PEH dispersions were consistent with values required for efficient oxygen delivery in the systemic circulation (60)
Single protein nanocapsule (SNP)	Human hemoglobin	Carrier of oxygen, use of polymer for drug delivery	Mechanical, heat and PH resistant, polymer layer can essentially stabilize different type of proteins, the quaternary hemoglobin structure does not change during preparation of SNP (61)
Hemoglobin conjugated biodegradable polymer micelles	Bovine hemoglobin	Carrier of oxygen	

- Polymersome-encapsulated Hb (PEH) เป็นผลิตภัณฑ์ที่มี Hb-loading capacity สูงกว่า NHPs และ Lipogel สามารถผลิตได้ในปริมาณมากและมีความสามารถในการขนส่งออกซิเจน เทียบเท่ากับเม็ดเลือดแดง นอกจากนี้ยังสามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 60 องศาเซลเซียส มีความคงตัวในน้ำเกลือเป็นเวลาหลายเดือนและมีความคงตัวในเลือดได้เป็นเวลาอย่างน้อย 5 วัน^{37, 38}

- Single-protein nanocapsules ฮีโมโกลบิน จะถูกล้อมรอบด้วยชั้นบางๆ ของหน่วยย่อย acrylamide และ bisacrylamide ซึ่งมีจุดเด่นคือ ความทนทานต่อความร้อน แรงเชิงกล และความ เป็นกรดต่าง (pH)

RBCs Differentiated Form Stem Cells²²

เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ได้จากสเต็มเซลล์ สามารถนำมาใช้ในกรณีที่ผู้ป่วยต้องได้รับการ เปลี่ยนถ่ายเลือดเป็นประจำ เช่นเดียวกับผู้ป่วยที่มี หนูเลือดหายากหรือมี autoantibodies

สเต็มเซลล์ได้มาจากหลายแหล่ง ได้แก่ ไช กระดูง, cord blood, embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells (iPSCs)

ปัญหาสำคัญของเม็ดเลือดแดงที่ได้จากวิธีนี้ คือการที่จะผลิตให้ได้ปริมาณมากๆ และค่าใช้จ่าย ในการผลิตที่สูง อย่างไรก็ตาม หากในอนาคต สามารถแก้ไขข้อจำกัดเหล่านี้ได้ก็จะทำให้ได้แหล่ง ของเม็ดเลือดแดงที่มีปริมาณไม่จำกัดและมีความ คล้ายคลึงกับเม็ดเลือดแดงตามธรรมชาติที่สุด รวมถึงช่วยลดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้น จากการรับเลือดจากผู้บริจาค³⁹

บทสรุป

จากการเพิ่มขึ้นของการถ่ายเลือดและความ กังวลเกี่ยวกับเชื้อโรคที่อาจติดต่อผ่านทางเลือด เป็นผลให้เลือดเทียมโดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่ม HBOCs เป็นที่สนใจอย่างมาก อย่างไรก็ตาม แม้ว่า จะมีผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ ออกมามากมาย แต่ก็ยัง

ไม่มีผลิตภัณฑ์ตัวใดสำหรับมนุษย์ที่ได้รับการ รับรองให้ใช้โดย US FDA ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัด หลัก สองประการคือผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นและค่า ครึ่งชีวิตที่สั้นทำให้ไม่ผ่านข้อกำหนด หากมี ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีมากขึ้นในอนาคตอาจ ทำให้สามารถพัฒนาสารที่สามารถใช้ทดแทนเลือด จริงได้ หรืออย่างน้อยที่สุดคือสารที่สามารถขนส่ง ออกซิเจนแทนเลือด ซึ่งจะสามารถช่วยลดปัญหา การขาดแคลนเลือดได้เป็นอย่างมาก

แนวโน้มการศึกษาเลือดเทียมในอนาคตจะ เน้นมากขึ้นในเรื่องสารที่ใช้ทดแทนเลือดจริง เช่น เม็ดเลือดแดงที่ได้จากสเต็มเซลล์ ซึ่งเป็นแหล่งของ เม็ดเลือดแดงที่ก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนที่น้อย ที่สุดและมีความคล้ายคลึงกับเม็ดเลือดแดงที่ได้ จากผู้บริจาคเลือดมากที่สุด

เอกสารอ้างอิง

1. Sharma A, Arora S, Grewal P, Dhillon V, Kumar V. Recent innovations in delivery of artificial blood substitute: a review. *Int J Appl Pharm.* 2011;3(2):1-5.
2. Tao Z, Ghoroghchian PP. Microparticle, nanoparticle, and stem cell-based oxygen carriers as advanced blood substitutes. *Trends Biotechnol.* 2014;32(9):466-473.
3. Cabrales P, Intaglietta M. Blood substitutes: evolution from non-carrying to oxygen and gas carrying fluids. *ASAIO J.* 2013;59(4):337.
4. Intaglietta M. Whitaker lecture 1996: microcirculation, biomedical engineering, and artificial blood. *Ann Biomed Eng.* 1997;25(4):593-603.
5. Suman S. Artificial blood. *Indian J crit Care Med.* 2008;12(3):140-144.
6. Anilkumar et al. A Review of Artificial Blood. *IJPCBS.* 2015;5(2):477-480.
7. Lane TA. Perfluorochemical-based artificial oxygen carrying red cell substitutes. *Transfus Sci.* 1995;16(1):19-31.

8. Biro GP, Blais P. Perfluorocarbon blood substitutes. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1987; 6(4):311–374.
9. Squires JE. Artificial blood. *Science.* 2002;295(5557):1002–1005.
10. Mushlin PS, Boucek RJ, Parrish MD, Graham TP, Olson RD. Beneficial effects of perfluorochemical artificial blood on cardiac function following coronary occlusion. *Life Sci.* 1985;36(22):2093–2102.
11. Shi Q, Huang Y, Chen X, Wu M, Sun J, Jing X. Hemoglobin conjugated micelles based on triblock biodegradable polymers as artificial oxygen carriers. *Biomaterials.* 2009;30(28):5077–5085.
12. Nishimura N, Nitsuno T, Naito R. Clinical studies of a perfluorochemical, whole blood substitute. *Critical Care Med.* 1981;9(3):168.
13. Bowman RJ. Red blood cell substitutes and artificial blood. *Hum Pathol.* 1983;14(3):218–220.
14. Eike JH, Palmer AF. Oxidized Mono-, di-, tri-, and polysaccharides as potential hemoglobin cross-linking reagents for the synthesis of high oxygen affinity artificial blood substitutes. *Biotechnol Prog.* 2004;20(3):953–962.
15. Lowe K. Perfluorinated blood substitutes and artificial oxygen carriers. *Blood Rev.* 1999;13(3):171–184.
16. Hoffman SJ, Looker DL, Roehrich JM, et al. Expression of fully functional tetrameric human hemoglobin in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(21):8521–8525.
17. Lui FE, Kluger R. Reviving artificial blood: meeting the challenge of dealing with NO scavenging by hemoglobin. *Chembiochem.* 2010;11(13):1816–1824.
18. Chang TMS. Blood substitutes based on nanobiotechnology. *Trends Biotechnol* 2006;24(8):372–377.
19. Bowes MP, Burhop KE, Zivin JA. Diaspirin cross-linked hemoglobin improves neurological outcome following reversible but not irreversible CNS ischemia in rabbits. *Stroke.* 1994;25(11):2253–2257.
20. Vane LA, Funston JS, Kirschner R, et al. Comparison of transfusion with DCLHb or pRBCs for treatment of intraoperative anemia in sheep. *J Appl Physiol.* 2002;92(1):343–353.
21. Chow MS, Fan C, Tran H, Zhao H, Zhou L. Effects of diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) during and post-CPR in swine. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;297(1):224–229.
22. Samira M, Ali JN, Mehryar HR. Artificial Blood Substitutes: First Steps on the Long Route to Clinical Utility. *Clinical Medicine Insights.* 2016:933-941
23. Li S, Nickels J, Palmer AF. Liposome-encapsulated actin-hemoglobin (LEAcHb) artificial blood substitutes. *Biomaterials.* 2005;26(17):3759–3769.
24. Pasut G. Polymers for protein conjugation. *Polymers.* 2014;6(1):160–178.
25. Winslow RM. MP4, a new nonvasoactive polyethylene glycol-hemoglobin conjugate. *Artif Organs.* 2004;28(9):800–806.
26. Jia Y, Wood F, Menu P, Faivre B, Caron A, Alayash AI. Oxygen binding and oxidation reactions of human hemoglobin conjugated to carboxylate dextran. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1672(3):164–173.
27. Crawford MW, Shichor T, Engelhardt T, et al. The novel hemoglobin-based oxygen carrier HRC 101 improves survival in murine sickle cell disease. *Anesthesiology.* 2007;107(2):281–287.
28. Hu T, Su Z. Bovine serum albumin-bovine hemoglobin conjugate as a candidate blood substitute. *Biotechnol Lett.* 2002;24(4):275–278.
29. Fronticelli C, Koehler RC. Design of recombinant hemoglobins for use in transfusion fluids. *Crit Care Clin.* 2009;25(2):357–371.
30. Varnado CL, Mollan TL, Birukou I, Smith BJ, Henderson DP, Olson JS. Development of

- recombinant hemoglobin-based oxygen carriers. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(17):2314–2328.
31. Graves PE, Henderson DP, Horstman MJ, Solomon BJ, Olson JS. Enhancing stability and expression of recombinant human hemoglobin in *E. coli*: progress in the development of a recombinant HBOC source. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1784(10):1471–1479.
32. Usuba A, Motoki R, Ogata Y, Suzuki K, Kamitani T. Effect and safety of liposome-encapsulated hemoglobin neo red cells (NRCs) as a perfusate for total cardiopulmonary bypass. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 1995;23(3):337–346.
33. Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, et al. Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. *Am J Pathol*. 2001;159(3):1079–1088.
34. Sou K, Klipper R, Goins B, Tsuchida E, Phillips WT. Circulation kinetics and organ distribution of Hb-vesicles developed as a red blood cell substitute. *J Pharmacol Exp Ther*. 005;312(2):702–709.
35. Xu F, Yuan Y, Shan X, et al. Long-circulation of hemoglobin-loaded polymeric nanoparticles as oxygen carriers with modulated surface charges. *Int J Pharm*. 2009;377(1):199–206.
36. Patton JN, Palmer AF. Photopolymerization of bovine hemoglobin entrapped nanoscale hydrogel particles within liposomal reactors for use as an artificial blood substitute. *Biomacromolecules*. 2005;6(1):414–424.
37. Rameez S, Alostta H, Palmer AF. Biocompatible and biodegradable polymersome encapsulated hemoglobin: a potential oxygen carrier. *Bioconjug Chem*. 2008;19(5):1025–1032.
38. Arifin DR, Palmer AF. Polymersome encapsulated hemoglobin: a novel type of oxygen carrier. *Biomacromolecules*. 2005;6(4):2172–2181.
39. Kim HO. In-vitro stem cell derived red blood cells for transfusion: are we there yet? *Yonsei Med J*. 2014;55(2):304–309.