Bundesgesundheitsbl -
Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz
1999 · 42: 113–117 © Springer-Verlag 1999

A. Hilger • M. Heiden • R. Seitz • Paul-Ehrlich-Institut, Langen

„Künstliches Blut“: Entwicklung von Blutersatzstoffen auf Hämoglobinbasis

Hintergrund, Strategien und offene Fragen

Zusammenfassung

Neue therapeutische Strategien in Chirugie, Transplantation und Krebstherapie werden dazu führen, daß der Bedarf an Blut und Blutkomponenten anhalten wird. Die Entwicklung künstlicher Sauerstoffträger für den klinischen Gebrauch ist wünschenswert, um die verschiedenen Probleme, die mit menschlichem Blut und Blutprodukten verbunden sind, zu vermeiden: z.B. das (inzwischen sehr kleine) Risiko der Übertragung infektiöser Krankheiten, die Notwendigkeit der Blutgruppenbestimmung und der blutgruppenkompatiblen Anwendung von Blut, die begrenzte Verfügbarkeit von Blutspenden und die für das empfindliche Blut erforderlichen speziellen Lagerbedingungen bei begrenzter Lagerfähigkeit. Natives, stromafreies Hämoglobin kann nicht als Blutersatz verwendet werden. Verschiedene Ansätze konnten aufgezeigt werden, um den Zerfall des freien Hämoglobins in seine Dimere nach der Injektion zu vermeiden. Durchgeführt wurden Modifikationen des Hämoglobin-Moleküls mittels Quervernetzung oder Konjugation, bzw. durch Einbringen in Mikropartikel. Mehrere präklinische und klinische Versuche wurden durchgeführt, mit unterschiedlichem Ergebnis bezüglich Indikation, Wirksamkeit und Nebenwirkungen im Vergleich zum nativen Blutprodukt. Weitere Forschung wird notwendig sein, um geeignete künstliche Hämoglobine zu entwickeln. Derzeit jedoch ist das klassische Spenderblut weit davon entfernt, durch Blutersatzstoffe überflüssig gemacht zu werden.

Blut ist ein multifunktionelles Transportmedium, ohne das zahlreiche lebenswichtige Funktionen des Organismus nicht ablaufen können. Eine der wesentlichen Errungenschaften der modernen Medizin ist die Möglichkeit, verlorenes Blut durch Transfusionen zu ersetzen. So sind Bluttransfusionen bei schweren Verletzungen häufig lebensrettend, aber auch viele Eingriffe der modernen Chirurgie wären ohne deren Verfügbarkeit nicht denkbar.

Die heutige Transfusionsmedizin hat ein großes Repertoire von Komponenten zur Verfügung, gemeint sind Arzneimittel, die durch Auftrennung des Blutes in seine Bestandteile und ggf. durch weitere Bearbeitung gewonnen werden. So ist eine gezielte und den Bedürfnissen des Patienten angepaßte Behandlung möglich.

Funktion des Blutes und von Blutersatzstoffen

Blut ist mit einem Anteil von ca. 7% an der Körpermasse das größte und gleichzeitig eines der komplexesten Organe des Körpers, in dem sowohl zelluläre als auch humorale Systeme vielfältige Funktionen wahrnehmen. Beispiele sind Erythrozyten, Phagozyten, Lymphozyten und Antikörper als Träger der spezifischen Immunabwehr sowie Kaskadensysteme wie Blutgerinnung und Komplementsystem [1]. Für die akut lebensrettende Wirkung, z.B. bei großen Blutverlusten, ist die Gewährleistung des Sauerstofftransportes ausschlaggebend. Es handelt sich bei „Kunstblut“ oder „Blutersatzstoffen” (im internationalen Schrifttum „Blood Substitutes“) nicht wirklich um eine echte Nachbildung des komplexen Mediums Blut, sondern um Substanzen, die (mehr oder weniger kurzfristig) bei einem Mangel an Erythrozyten die Versorgung der Gewebe mit Sauerstoff aufrechterhalten können.

Wenn nun Bluttransfusionen und insbesondere aus dem Blut hergestellte Komponenten wie Erythrozytenkonzentrate verfügbar sind, die die jeweils gebrauchte physiologische Funktion entfalten, stellt sich die Frage, weshalb versucht wird, Blutersatzstoffe zu entwickeln. Die Antwort liegt in der Hoffnung, folgende Probleme zu lösen:

Dr. Anneliese Hilger
Paul-Ehrlich-Institut, Abteilung Hämatologie und Transfusionsmedizin, Paul-Ehrlich-Straße 51–59, D-63225 Langen

Bundesgesundheitsbl -
Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz
1999 · 42: 113–117 © Springer-Verlag 1999

A. Hilger • M. Heiden • R. Seitz

„Artificial blood": Development of blood substitutes based on haemoglobin-molecules. Background, strategies and open questions

Summary

New therapeutic approaches in surgery, transplantation, and cancer therapy make likely that the need for blood and blood components will continue. The development of artificial oxygen carriers for clinical use appears to be desirable, to overcome several problems encountered with human blood and blood products: the risk of transmission of infectious diseases (which, however is very low meanwhile), the need for determination of blood groups and the use of compatible blood, the limited availability of blood donations, and the precautions necessary to store the liable blood components for a limited time. Native stroma free haemoglobin cannot be used as blood substitute. Different approaches to solve the problem of breakdown into dimers of stroma free haemoglobin after injection into circulation have been used. Modification of the haemoglobin-molecule has to be performed, either by crosslinking or conjugation, or by enclosure in encapsulated particles. Several preclinical and clinical trials have been carried out showing different results relating to their indication, efficacy and side effects compared to native blood products. Further investigations will be necessary to develop suitable artificial haemoglobins and to demonstrate their therapeutic value; so far, the classical donated blood is far from being superseded by artificial blood substitutes.

- Ein wichtiges Hindernis, das alle Ansätze zur Blutübertragung in früheren Jahrhunderten zum Scheitern verurteilt hatte, ist die Existenz der Blutgruppenantigene auf den Erythrozyten, die bei der Transfusion von inkompatiblem Blut zu schweren Unverträglichkeitsreaktionen bis hin zu tödlichen Zwischenfällen führen kann. Trotz aller Sorgfalt und aller Kontrollvorschriften ist eine Transfusion inkompatiblen Blutes nie ganz auszuschließen, sei es aufgrund von falschen Testergebnissen oder durch menschliches Versagen.

- Wie u.a. die katastrophale Erfahrung der HIV-Übertragungen in den frühen 80er Jahren zeigte, ist mit gespendetem Blut ein Infektionsrisiko verbunden, das durch sorgfältige Auswahl, Testung und Aufbereitung der Spenden sicher bis auf einen sehr kleinen Rest minimiert, aber letztlich nie ganz ausgeschaltet werden kann.

- Das Aufkommen an Spenderblut wird immer begrenzt sein. Für Patienten mit seltenen Blutgruppen stehen entsprechend wenige Konserven zur Verfügung. Besonders gravierend ist die Versorgungssituation aber in Entwicklungsländern, die nicht in der Lage sind, die Ressourcen für Aufbau und Unterhaltung eines Blutspendesystems aufzubringen.

- Blut ist empfindlich, es bedarf einer schonenden Behandlung und Lagerung und ist nur begrenzt haltbar (Erythrozytenkonzentrate bis zu 42 Tagen).

„Ein idealer Blutersatz sollte neben guter Verträglichkeit auch für weniger wohlhabende Länder erschwinglich sein."

Ein idealer Blutersatz sollte daher als Sauerstoffträger wirksam und gut verträglich, blutgruppenunabhängig anwendbar sowie möglichst infektionssicher, einfach transportierbar und lagerbar und bei alledem auch für weniger wohlhabende Länder erschwinglich sein.

Aufbau und Funktion des Hämoglobinmoleküls

Die Hauptfunktion der Erythrozyten ist der Transport des Sauerstoffs in das Gewebe sowie der Rücktransport von Kohlendioxyd aus den Zellen in die Lunge. Die Form einer flexiblen bikonkaven Scheibe von ca. 8 µm Durchmesser ermöglicht es den roten Blutkörperchen, Kapillargefäße von kleinstem Durchmesser zu passieren, um so einen effektiven Gasaustausch zu gewährleisten.

Die Funktion des Sauerstoff- beziehungsweise des Kohlendioxidtransports übernimmt ein hierfür spezialisiertes Protein, das Hämoglobin (Hb). Das Hb-Molekül besteht aus zwei Polypeptidpaaren, die in Abhängigkeit von ihrer Globinstruktur als α-, β-, γ- und δ-Ketten bezeichnet werden. Während der Embryonal- und Fetalentwicklung bis hin zum erwachsenen Stadium, herrschen je nach Entwicklungsphase unterschiedliche Hb-Typen mit entsprechend unterschiedlichen Globinkettenstrukturen vor. Die Strukturgene dieser Globinketten sind in zwei Gruppen von Genloci angeordnet. Die Gruppe für die β-, γ- und δ-Ketten sind auf Chromosom 11 und die der α-Kette auf Chromosom 16 lokalisiert.

Die Hämsynthese erfolgt in den Mitochondrien über eine Reihe von biochemischen Reaktionsschritten. Am Ende dieser Reaktionskette wird durch die Einführung von Eisen (FeII) in einen Protoporphyrring die Hämsynthese vollendet. Jedes Hämmolekül verbindet sich mit einer Globinkette, die an den Ribosomen synthetisiert wird. Die Bildung eines Tetramers aus vier Globinketten – jede mit ihrer in einer sogenannten Tasche anhängigen, prosthetischen Hämgruppe – vollendet die funktionale Struktur des Hämoglobinmoleküls.

Der Gasaustausch im Medium Blut wird bewirkt durch eine Veränderung der Globinkettenlage zueinander. Die Sauerstoffaffinität des Hämoglobinmoleküls wird u.a. durch 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG) modifiziert. Die Sauerstoffbindungskurve des Hämoglobins verläuft sigmoid, daß heißt, der P_{50}-Wert liegt bei einem gesunden

erwachsenen Menschen bei circa 26,6 mm Hg, wobei der P_{50}-Wert den Sauerstoffpartialdruck darstellt, bei dem die Hälfte des Hb mit Sauerstoff (O_2) gesättigt ist. Bei vermehrter O_2-Affinität bewegt sich die Kurve nach links, das heißt der Wert von P_{50} sinkt, wogegen sie sich entsprechend bei verminderter O_2-Affinität nach rechts verschiebt, einen Anstieg des P_{50}-Wertes implizierend. Bei gesunden Menschen liegt der O_2-Austausch in Sättigungsbereichen von 95% im arteriellen Blut und 70% im venösen Blut.

Künstliche Sauerstoffträger in Form von modifiziertem Hämoglobin

Natives zellfreies Hämoglobin kann nicht als Blutersatz verwendet werden. Der Grund dafür ist, daß hochgereinigtes und zellfreies Hämoglobin unter anderem starke nephrotoxische Reaktionen zur Folge hat und der gewünschte Effekt der Sauerstoffversorgung somit nicht gewährleistet ist. Da 2,3-DPG im Plasma nicht vorliegt, um das freie Hb zu binden, zerfällt isoliertes, zellfreies Hämoglobin nach der Infusion im Blutkreislauf in zwei Bruchstücke (Dimere), welche rasch durch die Niere ausgeschieden werden.

Die Modifizierung der Hämoglobinmoleküle ist ein Versuch, das Problem der mangelnden Sauerstoffversorgung und der toxischen Wirkung der zellfreien, isolierten Hämoglobine zu lösen. Verschiedene Ansätze führten zu der Entwicklung von Hämoglobinlösungen humanen, bovinen und rekombinanten Ursprungs, wobei die gentechnologisch produzierten Hämoglobine in Mikroorganismen (z. B. *Escherchia coli*), aber auch mittels transgener Tabakpflanzen hergestellt werden können. Um den extraerythrozytären Zerfall des Hämoglobinmoleküls zu verhindern und somit seine Sauerstofftransport und -freigabefunktion zu erhalten, sind Modifikationen z.B. über molekulare Vernetzung oder aber über die Umhüllung des Hämoglobinmoleküls entwickelt worden.

Vernetzte Hämoglobine

Die Vernetzung von isolierten Hämoglobinmolekülen, deren Gewinnung aus Erythrozytenkonzentraten durch eine Kaskade von Lysierungs- und Reinigungsschritten erfolgt, kann auf verschiedene Weise intra- oder intermolekular sowie mit unterschiedlichen Bindungssubstanzen erfolgen. Zur Vernetzung von Hämoglobinen werden Substanzen wie z.B. Sebacyl-Chlorid, Glutaraldehyd oder Diaspirin benutzt. Je nach Verbindungsstruktur handelt es sich um tetramere Hämoglobine, Polyhämoglobine oder konjugierte Hämoglobine [2].

Tetramere Hämoglobine

Tetrameres Hämoglobin wird hergestellt, indem das Molekül intramolekular stabilisiert und so der Zerfall in zwei dimere Ketten verhindert wird. Die somit erzielte Modifikation der 2,3-DPG-Lokalisation resultiert in einer O_2-Affinität bei einem P_{50}-Wert von etwa 20 bis 35 mm Hg [3].

Polyhämoglobine

Polyhämoglobine sind Hb-Modifikationen, welche aus vernetzten tetrameren Hb-Molekülen gebildet werden. Das heißt der Herstellungsprozess erfolgt über die intramolekulare Vernetzung zum Tetramer und anschließend über intermolekulare Verbindungen zum Polyhämoglobin mit einem P_{50}-Wert von circa 18 bis 28 mm Hg [3].

Konjugierte Hämoglobine

Konjugierte Hämoglobine können mittels Vernetzung einzelner Hämoglobinmoleküle mit einem löslichen Polymer, z.B. Dextran oder Polyethylenglykol [2], hergestellt werden. Durch die Konjugation können eine rasche Ausscheidung durch die Niere und entsprechende nephrotoxische Effekte verhindert werden [4, 5]. Die Sauerstoffaffinität liegt bei P_{50}-Werten von 18 bis 22 mm Hg [3].

Rekombinante Hämoglobine

Eine Entwicklung der jüngeren Zeit sind die rekombinanten Hämoglobine. Mit Hilfe der Gentechnologie können Hämoglobinmoleküle gewonnen werden, deren Struktur so modifiziert wurde, daß sie nicht in zwei Untereinheiten zerfallen [6]. Weitere Entwicklungen hinsichtlich der Ausbeute, dem Ausmaß der Genexpression und der Reinigung von möglichen Fremdzellbestandteilen sind notwendig und werden gegenwärtig diskutiert [2, 4].

Da modifiziertes, vernetztes Hämoglobin nicht von Zellstrukturen des Erythrozyten umhüllt ist, muß es hochgereinigt sein, um eventuelle unerwünschte Effekte zu vermeiden. Durch diese Reinigungsschritte werden aber auch alle Enzyme eliminiert, die normalerweise physiologisch notwendig in der Zelle vorliegen. Darüberhinaus ist die Lebensdauer vernetzter Hämoglobine relativ kurz, in der Regel zwischen zehn bis 20 Stunden [2].

Lösungsansätze mit dem Bestreben, die physiologische Funktion von Erythrozyten nachzuempfinden, führten zu der Entwicklung umhüllter Hämoglobinmoleküle.

Umhülltes Hämoglobin

Für die Umhüllung von Hämoglobinmolekülen wurden u.a. vernetzte Proteine, Lipide und Silikon unter Verwendung von Erythrozytenenzymen wie Carbonanhydrase und Katalase benutzt. Bei der Entwicklung dieser Hb-Mikrokapseln stellte sich die Aufnahme durch das retikuloendotheliale System als größtes Problem dar. Die derzeitigen Weiterentwicklungen beschäftigten sich mit Problemen der Veränderung der Oberflächengestaltung der Kapsel und der Größenverringerung sowie der Bioabbaubarkeit [2].

Zusammenfassung, Bewertung und Perspektiven

Um die Anforderungen an künstliche Sauerstoffträger erfüllen und optimieren zu können, wurden in den vergangenen Jahrzehnten zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, die verschiedene Modifikationsmodelle und Entwicklungsansätze zeigen und teilweise zu tierexperimentellen Untersuchungen und bereits zu ersten klinischen Studien geführt haben.

Zahlreiche Tierversuche mit den verschiedenen Hb-Modifikationen zeigen, daß artifizielle Hb-Lösungen, nach Ausbluten der Versuchstiere, ihre Funktion als Sauerstoffträger erfüllen können, zum Teil jedoch begleitet von Nebenwirkungen unterschiedlichen Ausmaßes. So gibt es beispielsweise Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Infusion künstlicher Hb-Lösungen mit einer Abnahme der Blutplättchen, vermehrter Aggregation der Blutzellen, erhöhter Sepsisgefahr und Schädigung der glatten Muskulatur [7–14]. Die Wirkmechanismen solcher Effekte bleiben überwiegend ungeklärt und bedürfen weiterer Untersuchungen. Die O_2-Sättigung des Gewebes erfolgt über die umgebenden Kapillargefäße, deren Durchlässigkeit über die Blut heranführenden Arteriolen gesteuert wird, das heißt ein verringertes Sauerstoffangebot in den Arteriolen führt zur Erweiterung der Kapillaren und umgekehrt. Künstliche Hb-Lösungen ermöglichen eine effektivere Sauerstoffabgabe an den Arteriolenwänden als normales Blut. Es wird angenommen, daß diese Eigenschaft des artifiziellen Hämoglobins zu einer Deregulation der Kapillargefäße führen könnte, in dem die kapillare Durchlässigkeit bei hohem Sauerstoffangebot verringert wird [11, 15].

Es wurden keine nephrotoxischen Auswirkungen der getesteten modifizierten Hb-Lösungen gefunden, wohingegen vasokonstriktorische Effekte von mehr oder weniger starkem Ausmaß beschrieben werden. Die Beobachtung des Auftretens gastrointestinaler Effekte und Blutdruckerhöhung wird im Zusammenhang mit dem Stickoxid-(NO)-Mechanismus diskutiert. NO aus den endothelialen Zellen hat eine wichtige Rolle als Regulator des Gefäßtonus. Erniedrigte NO-Konzentrationen haben einen vasokonstriktorischen Effekt zur Folge, während ein Anstieg von NO eine Erweiterung der Gefäße bewirkt [2]. Die Fähigkeit künstlicher Hb-Lösungen, NO zu binden und somit vasokonstriktorische Effekte zu steigern, kann im Hinblick auf Anwendungen beim Menschen, je nach der klinischen Situation, als Nachteil angesehen werden [16] oder erwünscht sein [17]. So könnte sich eine Erhöhung des Gefäßwiderstandes bei Herzkranken als ungünstig erweisen, ein Blutdruckanstieg bei Patienten im septischen Schock aber einen Vorteil darstellen.

„Erste klinische Studien zeigen innerhalb eines begrenzten Dosisbereiches prinzipiell die Wirksamkeit und Sicherheit künstlicher Hb-Lösungen. Sie belegen noch keine Überlegenheit gegenüber konventionellen Blutprodukten."

Die verschiedenen Ansätze, Hb-Moleküle zu modifizieren, resultieren in einem variierenden P_{50}-Wert und in einer unterschiedlichen Verweildauer im Blutkreislauf. Aus diesen charakteristischen Eigenschaften eines jeden Modifikationstyps können unterschiedliche Einsatzmöglichkeiten abgeleitet werden. Studien, die einen Schutz vor Nierenversagen, Stimulierung der Erythropoese und eine Unterstützung der Chemotherapie bzw. Bestrahlung bei Tumorpatienten in Korrelation mit dem Einsatz von modifizierten Hb-Lösungen untersuchen, erzielen im Tierversuch günstige Ergebnisse.

Veröffentlichungen von Ergebnissen klinischer Studien, die überwiegend in den USA durchgeführt wurden, zeigen innerhalb eines begrenzten Dosisbereiches prinzipiell die Wirksamkeit und Sicherheit der künstlichen Hb-Lösungen. An Nebenwirkungen wurden reversible Begleiterscheinungen wie Schwindelgefühl, Kopfschmerzen und gastrointestinale Beschwerden beschrieben [11].

In klinischen Versuchen wird über den Einsatz künstlicher Hb-Lösungen als Kurzzeitapplikation bei Blutverlust im Zusammenhang von operativen Eingriffen oder bei der Notfallversorgung von Traumapatienten am Unfallort berichtet [2]. Die bisher vorliegenden vorläufigen klinischen Ergebnisse belegen allerdings noch nicht die Überlegenheit gegenüber der Behandlung mit konventionellen Blutprodukten. Bisher kann die Hypothese, der Einsatz herkömmlicher Blutpräparate in der elektiven Chirurgie würde deutlich verringert werden, nicht stichhaltig nachgewiesen werden.

Es zeichnet sich dennoch ab, daß künstliche Sauerstoffträger einige Vorteile haben könnten. Die Anforderungen hinsichtlich der Infektionssicherheit, der Kompatibilität und der raschen, problemlosen Verfügbarkeit werden erfüllt und sind von Vorteil gegenüber nativen Blutkomponenten.

- Durch den speziellen Herstellungsablauf von modifiziertem Hämoglobin kann nach dem derzeitigen Kenntnisstand die Übertragung bekannter infektiöser Krankheiten (z.B. Aids oder Hepatitis B und C) nahezu ausgeschlossen werden.

- Die meisten artifiziellen Hb-Lösungen haben, bei nicht aufwendigen Lagerungsbedingungen, eine Haltbarkeit von über einem Jahr. Herkömmliche Erythrozytenkonzentrate verfallen nach fünf bis Wochen und müssen dabei möglichst konstant zwischen 2 und 6°C gelagert werden.

- Modifizierte Hämoglobinlösungen enthalten aufgrund einer Kaskade von Lysierungs- und Reinigungsschritten keine Zellmembranstrukturen mit Blutgruppenantigenen. Deshalb ist die Beachtung von Blutgruppen und die bei nativen Blutkomponenten übliche Verträglichkeitsprobe (Kreuzprobe) nicht notwendig.

Der Wegfall der Kreuzprobe für modifizierte Hämoglobine erspart Arbeitskraft und Zeit. Noch schwerer wiegt aber, daß somit ein sofortiger Einsatz unabhängig von einem Blutgruppenlabor, z.B. im Notarztwagen oder am Unfallort, möglich würde. Allerdings sind klinische Studien bei solchen schwerstkranken Patienten aufgrund der multiplen Einflußfaktoren seitens der Erkrankung bzw. Verletzung und seitens der multimodalen modernen Intensivtherapie sehr komplex und nur schwierig durchführbar und interpretierbar.

„Zur Zeit sind wir noch weit davon entfernt Blutspenden durch Kunstblut unnötig zu machen."

Bisher ist die Vision einer zwanglosen Austauschbarkeit von modifizierten Hämoglobinen gegen Blutkonserven noch nicht realisierbar, in speziellen Situationen zeichnen sich jedoch Einsatzgebiete ab. Die jüngsten Entwicklungen, insbesondere hinsichtlich der Herstellung rekombinanter Hämoglobine und umhüllter Hb-Moleküle, lassen weiterhin auf interessante Forschungsbereiche und Chancen für den therapeutischen Bedarf hoffen. Zur Zeit sind wir allerdings noch weit davon entfernt, Blutspenden durch „Kunstblut" unnötig zu machen.

Literatur

1. Seitz R, König, H, Dodt J (in press) **Blood.** In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Sixth Edition on CD ROM
2. Chang TMS (1998) **Modified haemoglobin-based blood subsititutes: crosslinked, recombinant and encapsulated haemoglobin.** Vox Sanguinis 74 [Suppl 2]: 233–241
3. Northoff H, Dinkelmann S (1996) **Artificial oxygen carriers – state of the art.** Biomedical Progress 9: 37–41
4. Winslow RM (1996) **Blood Substitutes in Development.** Ashley Publications Ltd, pp 27–37
5. Shorr RG, et al. (1996) **Phase 1B safety evaluation of PEG hemoglobin as an adjuvant to radiation therapy in human cancer patients.** Art Cells Blood Subst Immob Biotech 24: 407
6. Hoffman SJ, et al. (1990) **Expression of fully functional tetrameric human hemoglobin in escheria coli.** Proc Natl Acad Sci USA 87: 8521–8525
7. D'Agnillo F, Chang TM (1998) **Polyhemoglobin-superoxide dismutase-catalase as a blood substitute with antioxidant properties.** Nature Biotechnology 16: 667–671
8. Nose Y (1998) **Oxygen-carrying macromolecules: therapeutic agents for the treatment of hypoxia.** Artificial Organs 22: 618–622
9. Whitley D, et al. (1998) **Cell-free hemoglobin preserves renal function during normothermic ischemia.** Journal of Surgical Research 77: 187–191
10. Whiteford M, et al. (1998) **Effect of liposome-encapsulated hemoglobin on the development of endotoxin-induced shock in the rat.** Shock 9: 428–433
11. Piper IR, et al. (1998) **Effects of diaspirin cross-linked haemoglobin on post-traumatic cerebral perfusion pressure and blood flow in a rodent model of diffuse brain injury.** British Journal of Anaesthesia 80: 639–643
12. Bone HG, et al. (1998) **Pyridoxalated hemoglobin polyoxethylene conjugate reverses hyperdynamic circulation in septic sheep.** Journal of Applied Physiology 84: 1991–1999
13. Alonsozana GL, et al. (1997) **In vitro interference of the red cell substitute pyridoxalated hemoglobin-polyoxyehtylene with blood compatibility, coagulation and clinical chemistry testing.** Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia 11: 845–850
14. Phillips WT, et al. (1997) **Platelet reactivity with liposome-encapsulated hemoglobin in the rat.** Experimental Hematology 25: 1347–1356
15. Johnson PC, et al. (1995) **Oxygen delivery regulation: Implications for blood substitutes.** In: Blood Substitutes, p 175
16. Stetter MN, et al. (1997) **Influence of a recombinant haemoglobin solution on blood rheology.** Transfusion Vol 37: 1149–1155
17. Heneka MT, et al. (1997) **Polymerized hemoglobin restores cardiovascular and kidney function in endotoxin-induced shock in the rat.** J Clin Invest Vol 99: 47–54