

## 🕒 VIème journée normande d'anesthésie-réanimation

### Solutions d'hémoglobine et les fluorocarbones

*D. Sirieix, A. Nicolas-Robin, J.-F. Baron*

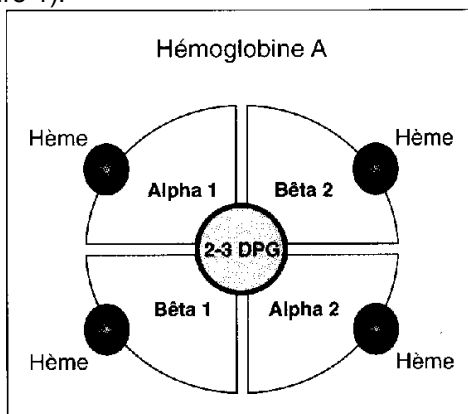
*Service Nadia du Bouchet, Anesthésie-Réanimation, hôpital Broussais, 96, rue Didot, 75014 Paris.*

Les transporteurs d'oxygène doivent être pourvus des propriétés leur permettant de transporter et échanger l'oxygène et le gaz carbonique. Actuellement, seuls les solutions d'hémoglobine et les fluorocarbones font l'objet de recherches cliniques avancées. La production de solution d'hémoglobine fait appel à différentes sources de matériel posant des problèmes différents, sang humain, sang bovin, hémoglobine recombinante. Quelle que soit son origine, la solution d'hémoglobine doit être parfaitement purifiée, avoir une affinité normale pour l'oxygène en l'absence de 2,3 DPG et une persistance intravasculaire suffisante. Différents traitements chimiques ou modifications génétiques ont permis de réaliser ces objectifs. La plupart des solutions ont été testées avec des modèles animaux de choc hémorragique et se sont avérées efficaces. L'effet vasoconstricteur observé dans la plupart des études contribue à restaurer l'état hémodynamique. Il a été démontré que cet effet était en partie lié à la fixation du NO par l'hémoglobine. Les fluorocarbones constituent l'autre voie de recherche pour le développement d'un transporteur de l'oxygène de nature chimique. Les préparations actuelles sont fortement concentrées et stables à température ambiante. Ces nouvelles solutions sont préparées sous forme d'émulsions lipidiques pratiquement prêtes à l'emploi. Le transport de l'oxygène par les fluorocarbures est une relation linéaire du fluorocrite et de la PO<sub>2</sub>. Les fluorocarbones facilitent l'utilisation périphérique de l'oxygène par différents mécanismes. Associés aux différentes techniques d'épargne sanguine, les transporteurs d'oxygène devraient augmenter la marge de sécurité de l'hémodilution et réduire l'utilisation des produits sanguins homologues. L'infarctus du myocarde à la phase aiguë, la circulation extracorporelle et la ventilation liquide sont d'autres applications potentielles. Les études cliniques actuellement en cours permettront de préciser les indications et de définir les modalités d'utilisation.

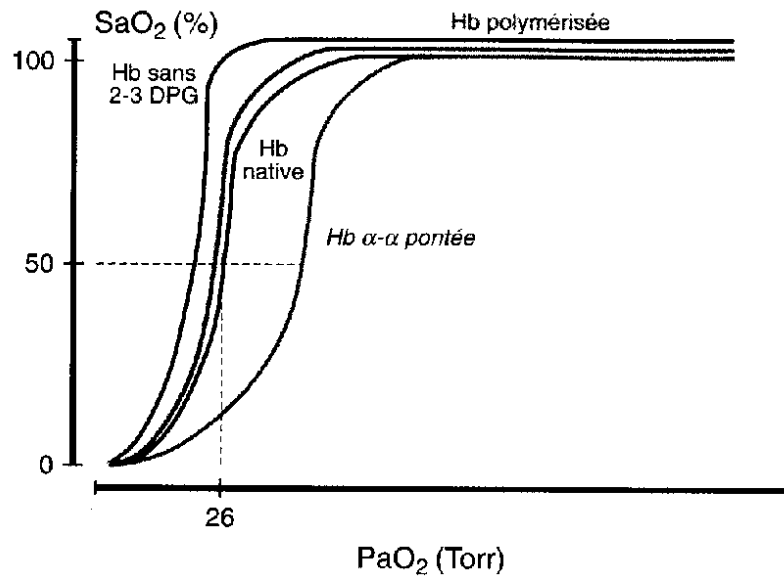
La transfusion de concentrés érythrocytaires en cas de spoliation sanguine est justifiée par la nécessité de maintenir un apport d'oxygène aux tissus et notamment aux organes vitaux dont certains, comme le cœur, sont incapable de faire face de façon prolongée à un déficit d'apport en oxygène. Toutefois, les problèmes liés à la transfusion homologue, transmission d'agents contaminants, immuno-suppression, ont sensibilisé les médecins à la nécessité d'économiser les produits sanguins. Ainsi, pour limiter ces risques, les techniques d'hémodilution et de transfusion autologue différée se sont développées. Néanmoins, la disponibilité de produits sanguins, notamment en cas d'urgence, voire sur les lieux mêmes de l'accident, reste un problème insurmontable par ces techniques. Les transporteurs d'oxygène doivent être pourvus des propriétés leur permettant de transporter et échanger l'oxygène et le gaz carbonique, mais aussi de maintenir la volémie. L'absence d'effets secondaires majeurs ou répresseurs sur la régénération des éléments sanguins et leur élimination totale dans un délai raisonnable sont d'autres propriétés indispensables. De plus, ils nécessitent d'être manufacturés à grande échelle en lots homogènes, à un coût acceptable. Enfin ils doivent être stérilisables, facilement stockables et simples d'emploi. Actuellement, seuls les solutions d'hémoglobine et les fluorocarbones répondent au moins en partie à ce cahier des charges.

#### Les solutions d'hémoglobine

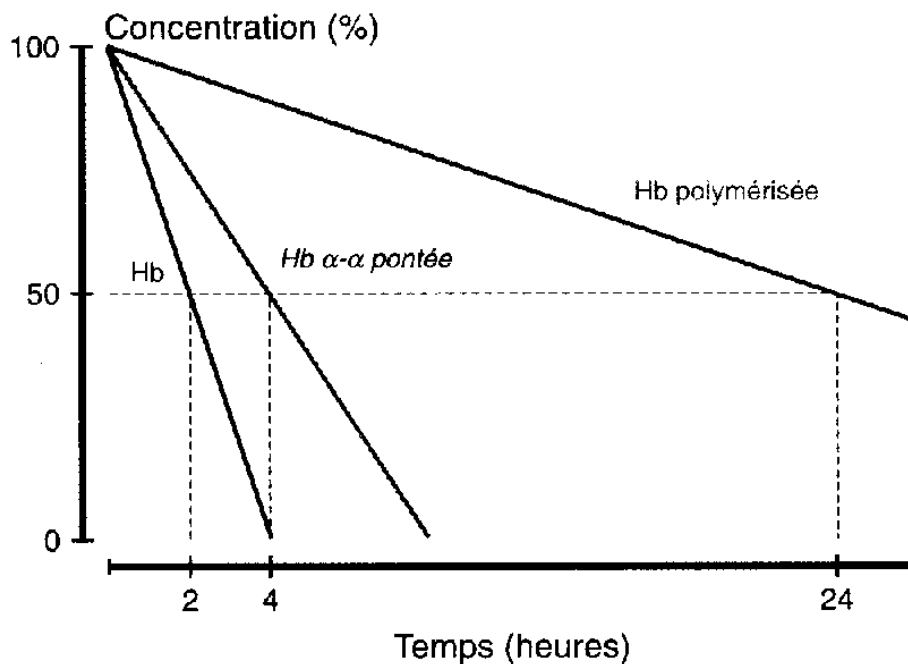
L'hémoglobine naturelle est une molécule tétramérique de poids moléculaire proche de 60 000, formée de 2 sous-unités alpha et 2 sous-unités bêta (figure 1).



Le fer de chaque hème est porté sur la chaîne d'hémoglobine près d'un radical histidine. L'hémoglobine apparaît sous deux formes: l'oxyhémoglobine ayant une grande affinité pour l'oxygène et la désoxyhémoglobine à faible affinité pour l'oxygène. Le passage de la première à la deuxième forme est facilité par la présence dans le globule d'un effecteur allostérique le 2,3 di-phosphoglycérate. La courbe de dissociation de l'hémoglobine caractérise la relation entre le contenu en oxygène et la pression partielle en oxygène (figure 2).



La P50, valeur de la PO<sub>2</sub> correspondant à une saturation de 50 % de l'hémoglobine définit l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène, sa valeur normale se situe entre 26 et 27 mmHg. Le métabolisme de l'hémoglobine est complexe, l'hémoglobine libre est rapidement fixée par les protéines plasmatiques. Le fer hémique est oxydé et le dimère alpha, Bêta est capté par l'haptoglobine puis est métabolisé. Quand la capacité de fixation de l'haptoglobine est dépassée, les dimères et les monomères sont filtrés et réabsorbés par le rein. Lorsqu'une grande quantité d'hémoglobine libre est présente dans le plasma, la réabsorption rénale peut être saturée. La première utilisation d'érythrocytes hémolysés a été rapportée en 1868. La toxicité rénale et les troubles de la coagulation à type de coagulation intravasculaire disséminée ont été les problèmes majeurs rencontrés avec les solutions initiales. La première expérience " positive " a été publiée en 1949 par Amberson et *al.* qui avaient perfusé de petits volumes d'une solution d'hémoglobine humaine à une jeune femme en état de choc durant le post-partum [1]. Vingt ans plus tard, Rabiner et *al.* ont traité vingt patients en état de choc hémorragique avec 180 à 300 mg/kg d'hémoglobine libre et ont rapporté une amélioration clinique de ces patients. Savitsky et *al.* ont testé l'administration de 250 ml d'une solution d'hémoglobine chez huit volontaires sains, et n'ont observé que quelques effets secondaires mineurs: douleur abdominale, sensation de malaise généralisé, bradycardie associée à une augmentation modérée de la pression artérielle, anomalie mineure de la coagulation et altération de la fonction rénale spontanément résolutive en six heures [2]. Pour l'essentiel, les effets secondaires étaient attribuables à la présence de résidus membranaires. Les solutions d'hémoglobine nécessitent une purification parfaite au cours d'un processus de préparation complexe pour éliminer les moindres débris membranaires [3]. Des solutions d'hémoglobine ayant un très haut degré de pureté sont désormais fabriquées par plusieurs laboratoires pharmaceutiques. La production de solution d'hémoglobine fait appel à trois sources de matériel posant des problèmes différents. Une solution peut être fabriquée à partir de sang humain, concentrés érythrocytaires périmés. Dans ce cas, la disponibilité de la matière première reste évidemment limitée. La préparation de solution d'hémoglobine à partir de sang bovin permet de surmonter cette difficulté mais pose les problèmes inhérents aux produits biologiques d'origine animale. Enfin, l'hémoglobine peut être produite par génie génétique. Cette approche a l'avantage de permettre la production d'une hémoglobine humaine modifiée pour améliorer sa stabilité et son affinité pour l'oxygène. Cependant, l'hème produit par cette méthode l'est en quantité insuffisante, ce qui nécessite l'adjonction d'hème d'origine bovine provenant d'animaux soigneusement sélectionnés. La production d'hémoglobine recombinante par des animaux transgéniques est une autre approche intéressante. Le risque de transmission virale est pratiquement virtuel pour toutes les formes d'hémoglobine modifiée. Pour les hémoglobines d'origine humaine ou animale, les agents viraux, potentiellement présents dans l'hémoglobine extraite de globules rouges sont inactivés par chauffage, filtration et/ou solvant/détergent. L'efficacité de ces processus a été validée pour les virus de l'immunodéficience humaine, le cytomégalovirus et le virus de l'hépatite B [4]. Par ailleurs, d'autres techniques utilisées au cours des étapes de fabrication, comme l'ultrafiltration, sont de nature à éliminer les virus et donc à accroître la sécurité de ces solutions. Après les premiers essais, l'enjeu fut la production d'une hémoglobine ayant une affinité normale pour l'oxygène en l'absence de l'effecteur allostérique naturel, le 2,3 di-phosphoglycérate, et pourvue d'une persistance intravasculaire suffisante, le tétramère facilement dissociable étant rapidement éliminé. De fait, les solutions d'hémoglobine modifiées doivent posséder des propriétés de transport de l'oxygène au moins équivalentes à celle du sang, avec une P50 proche de 26mmHg. De plus, elle doit rester dans la circulation assez longtemps pour éviter les administrations répétées (figure 3).



La viscosité, la pression colloïdo-osmotique, l'osmolarité et les propriétés rhéologiques de ces solutions doivent être comparables à celles du sang. Pour cela, l'hémoglobine doit être modifiée chimiquement ou génétiquement. Différentes approches ont été explorées. A la suite des travaux de Benesch, la pyridoxylation fut la première voie de recherche. L'hémoglobine pyridoxylée est obtenue par le couplage covalent sur une fonction amine de l'hémoglobine, de phosphate de pyridoxal remplaçant l'effecteur allostérique naturel, le 2,3 di-phosphoglycérate. Cette modification chimique restaure une affinité normale de l'hémoglobine pour l'oxygène et a permis le développement de produits faisant actuellement l'objet d'essais cliniques [5]. Le pontage intramoléculaire par liaison covalente entre les chaînes alpha ou bêta est une alternative intéressante. La voie ayant fait l'objet du développement le plus important consiste en l'utilisation du 3,5-bis dibromosalicyl fumarate (diaspirine) [6]. Cette modification permet de réduire l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène et de prolonger sa persistance intravasculaire. Cette préparation est suffisamment stable pour supporter la pasteurisation. L'hémoglobine peut être produite par génie génétique au moyen de cultures d'E. Coli [7]. Des mutations dirigées du génome bactérien ont permis d'accroître le pouvoir oxyphorique et de stabiliser le tétramère en créant un pont intramoléculaire. La production d'une telle solution reste très onéreuse et un risque théorique de contamination endotoxinique persiste. Les problèmes d'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène et de stabilisation du tétramère ayant été résolus au fil des années, la question de la polymérisation demeure incomplètement tranchée. Bien que la stabilisation du tétramère d'hémoglobine ralentisse l'élimination de la solution d'hémoglobine, la demi-vie d'élimination est d'environ 6-8 heures. La polymérisation de l'hémoglobine permet d'augmenter la demi-vie d'élimination jusqu'à 24 heures et de diminuer la pression oncotique de la solution. Il est alors possible d'obtenir des solutions plus concentrées iso-oncotiques et peu visqueuses. Les molécules d'hémoglobine peuvent être polymérisées grâce à différents agents, les plus fréquemment utilisés sont le glutaraldéhyde ou le o-raffinose. Diverses hémoglobines polymérisées ont été décrites et font l'objet d'essais cliniques [5, 8, 9]. Bien que n'ayant pas encore atteint le stade des essais cliniques, une dernière approche mérite d'être signalée pour le futur: il s'agit de l'encapsulation de l'hémoglobine. Comme nous le reverrons, afin de prolonger la durée d'action des hémoglobines modifiées et de limiter l'interférence entre l'hémoglobine et le NO, l'encapsulation de l'hémoglobine au sein de liposomes peut être réalisée [10]. Mais le problème de la production à grande échelle et le coût élevé limitent actuellement le développement de ces techniques. La plupart des solutions ont été testées au moyen des modèles animaux de choc hémorragique et ont démontré leur efficacité [9, 11]. Des résultats particulièrement convaincants ont été obtenus avec l'hémoglobine *alpha-alpha* pontée à la diaspirine (DCLHb) [12]. L'effet vasoconstricteur observé avec les solutions d'hémoglobine contribue à restaurer l'hémodynamique [13-16]. L'administration de solutions d'hémoglobine augmente rapidement la pression artérielle, le débit cardiaque, le transport en oxygène et rétablit le débit sanguin dans la plupart des organes. L'augmentation de la pression artérielle moyenne persiste plusieurs heures. Chez des rats normovolémiques, perfusés avec des posologies croissantes de DCLHb [14], la pression artérielle moyenne augmente proportionnellement à la dose. La fréquence cardiaque est diminuée de 30 % à toutes les posologies. Les réponses aux doses de l'hémoglobine DCLHb ont été particulièrement étudiées [17]. La pression artérielle moyenne augmente immédiatement et atteint sa valeur maximale en 10 minutes. Par ailleurs, l'amplitude et la durée de cette réponse vasopressive est dépendante de la dose. L'analyse de la relation concentration-pression artérielle suggère qu'il n'existe pas de seuil à effet vasopresseur de ces solutions. Autrement dit, toute augmentation de la concentration de DCLHb s'accompagne d'une augmentation de la pression artérielle moyenne jusqu'à un plateau correspondant à une valeur bien définie de concentration plasmatique d'hémoglobine. L'effet vasopresseur des solutions d'hémoglobine ne compromet pas l'oxygénation des tissus. Dans une étude comparative contre des cristalloïdes, la réanimation d'un choc hémorragique chez le rat s'accompagne d'une augmentation significative de la saturation veineuse en oxygène, dans le groupe recevant la solution d'hémoglobine, suggérant une adéquation entre

l'apport et la consommation d'oxygène des tissus [12]. La technique des microsphères marquées [18] a permis de montrer que la diminution des débits sanguins régionaux observée dans la plupart des tissus lors d'une hémorragie massive était immédiatement corrigée après l'administration de DCLHb. Les mécanismes de l'effet vasopresseur des solutions d'hémoglobine ont été étudiés par de nombreux essais. Aussi il est admis que l'effet hypertenseur des solutions d'hémoglobine est lié en partie à la fixation du NO par l'hémoglobine [13, 19]. De plus, il est probable que les solutions d'hémoglobine stimulent la libération des catécholamines et d'autres agents vasoconstricteurs, comme l'endothéline [20-22]. Il a été récemment montré la possibilité de produire une hémoglobine recombinante ayant une affinité diminuée pour le NO. Les solutions d'hémoglobine font actuellement l'objet d'études cliniques destinées à préciser leurs indications et leurs conditions d'utilisation. Il est clair que les indications potentielles de ces solutions sont nombreuses. Cependant, seuls les résultats des études cliniques réalisées chez les volontaires sains ou utilisant des doses non thérapeutiques ont fait l'objet de publications dans la littérature internationale. Ainsi, une solution d'hémoglobine bovine polymérisée (Biopure corp. Upjohn) a été administrée à 11 patients. Une diminution du débit cardiaque et une augmentation de la pression artérielle ont été observées [8]. Ces effets furent réversibles en 6 à 24 heures selon la dose administrée (14 à 28 g). Récemment, une autre étude a été publiée avec cette même solution d'hémoglobine d'origine bovine. L'objectif de l'essai était d'évaluer la capacité d'adaptation à l'effort de sujets recevant soit une transfusion autologue, soit la solution d'hémoglobine [23]. Ces auteurs concluaient que l'adaptation à l'effort était la même dans les deux groupes et que les effets physiologiques de 1 g de solution d'hémoglobine étaient les mêmes que ceux observés après la transfusion de 3 g d'hémoglobine intra-érythrocytaire. Une solution d'hémoglobine recombinante (Somatogen-rilly) a été utilisée chez 16 patients à une posologie maximum de 11 g [7] chez ces volontaires sains, aucune toxicité rénale, ou hypertension n'ont été observées, mais des effets secondaires mineurs ont été décrits, céphalées, myalgies, frissons, hyperthermie. Tous ceux-ci ont regressé après l'administration d'anti-inflammatoires non stéroïdiens. Les résultats d'une étude de phase I réalisée en double aveugle avec la solution d'hémoglobine humaine DCLHB (Baxter Corp.) ont également été publiés [24]. Des patients ont reçu des doses croissantes de 0,025 à 0,1 g/kg de cette solution en 30 minutes. L'effet majeur fut une augmentation de la pression artérielle moyenne. Il n'existait pas de signe de vasoconstriction périphérique. Dans deux cas, une augmentation transitoire des CPK a été rapportée. Différents essais de phase II et III sont en cours de réalisation. Les améliorations considérables des méthodes de purification et de préparation des solutions d'hémoglobine ont rendu possible la mise au point de produits pouvant être administrés chez l'homme. Pratiquement, toutes les solutions entraînent une augmentation de la pression artérielle. Les résultats des différentes études de phases II et III, actuellement en cours, sont nécessaires avant de tirer des conclusions quant à leurs indications et à leurs modalités d'utilisation.

## Les fluorocarbones

Les fluorocarbones constituent l'autre voie de recherche pour le développement d'un transporteur de l'oxygène de nature chimique. Depuis qu'en 1966, Clark et Gollan ont montré qu'un rat pouvait survivre en respirant un fluorocarbure oxygéné, de nombreux progrès ont conduit au développement de générations successives de fluorocarbones [25-27]. Ces produits dérivent des hydrocarbures par substitution maximale de fluor et d'hydrogène. Ce sont des composés de faible masse moléculaire, liquides, limpides, peu visqueux, denses, totalement synthétiques, possédant une forte capacité de dissolution des gaz. Insolubles en milieu aqueux, leur émulsion lipidique peut être administrée par voie intraveineuse. Pendant les années 80, l'industrie n'avait produit que des solutions diluées contenant au maximum 20% de fluorocarbones, et utilisant le Pluronique F68 comme principal émulsifiant. Le principal représentant de ce type de fluorocarbure était le Fluosol (Green Cross, Japon). Ce produit était instable à température ambiante et nécessitait une conservation par congélation. D'abord utilisé comme traitement des anémies majeures, le Fluosol a été agréé aux Etats-Unis en 1983 pour l'oxygénation myocardique au cours de l'angioplastie coronaire [28]. Réputé peu efficace car peu concentré, le développement de ce produit est désormais arrêté. A partir de 1986, sont apparues des préparations plus concentrées (150 %) et stables à température ambiante [27, 29]. Ces nouvelles solutions sont préparées sous forme d'émulsion lipidique pratiquement prêtes à l'emploi. Les produits les plus récents utilisent des phospholipides de jaune d'oeuf. Oxygent (Alliance, Pharm, Lohson and Johnson) et Oxufluor (Hemagen, Baxter Corp) font actuellement l'objet d'un développement clinique. Les perfluorocarbones sont biologiquement inertes. Ainsi, ils ne sont pas métabolisés et sont donc partiellement accumulés [30]. Une partie est exhalée par le poumon et à un moindre degré, perspirée par la peau. Le système réticuloendothélial, après phagocytose lysosomiale, assure leur dégradation. L'élimination dans les fecès et dans les urines est pratiquement nulle. Leur vitesse d'élimination dépend de leur tension de vapeur, de leur structure et de leur poids moléculaire. Les fluorocarbones ont une efficacité comme transporteurs de l'oxygène de quelques heures (quatre à six heures) mais leur élimination est bien plus lente avec une demi-vie d'élimination d'environ sept jours. Leurs effets secondaires sont limités, un syndrome grippal et une thrombopénie sont souvent rapportés. L'utilisation intraveineuse des fluoro-carbones comme transporteurs d'oxygène repose sur leurs deux caractéristiques principales: forte capacité de dissolution de l'oxygène et du gaz carbonique, inertie chimique et biologique. La solubilité de l'oxygène est 2,5fois plus grande dans les fluorocarbones que dans le sang et l'eau, alors que celle du CO<sub>2</sub> reste peu changée. Le transport de l'oxygène par les fluorocarbures est une fonction linéaire du fluorocrite et de la PO. Les fluorocarbones facilitent l'utilisation périphérique de l'oxygène par différents mécanismes. D'abord, la pression partielle artérielle en oxygène étant plus élevée, le gradient de diffusion est plus large (3). La petite taille des particules de fluorocarbure, 1/70 de la taille des globules rouges, facilite le recrutement capillaire et augmente la

surface d'échange. Enfin, les fluorocarbones servant de transporteurs relais entre les hématies et les tissus, ils augmentent l'extraction de l'oxygène transportée par l'hémoglobine [31]. Les nombreux travaux expérimentaux ont permis de proposer différentes indications potentielles pour les émulsions fluorocarbonées. Au cours de la chirurgie hémorragique, l'utilisation des fluorocarbones seuls ou associés à d'autres techniques d'économie de sang permettraient d'améliorer la tolérance à l'hémodilution et éventuellement de réaliser des économies de produits sanguins. Lors des phénomènes d'ischémie, de par leur petite taille particulière et leur faible viscosité, les fluorocarbones peuvent irriguer des territoires faiblement vascularisés en améliorant les circulations collatérales et en facilitant la diffusion de l'oxygène. Dans le domaine cardiovasculaire, le traitement de l'infarctus du myocarde à la phase aiguë semble être une voie prometteuse. Ces solutions sont également intéressantes pour le circuit d'amorçage de la circulation extra-corporelle, permettant de réaliser une hémodilution profonde et bien tolérée. Elles contribueraient également à dissoudre les microbulles générées par la circulation extra-corporelle [32]. Dans le domaine de la cancérologie, les fluorocarbones pourraient augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses à la radiothérapie et à la chimiothérapie. La réanimation des insuffisances respiratoires aiguës est un autre champ d'application avec le concept de ventilation liquide. Les fluorocarbones sans émulsion lipidique diffusent rapidement, uniformément, et peuvent reperméabiliser les alvéoles collabées pour faciliter les échanges gazeux [33]. D'autres utilisations sont envisageables pour le traitement des embolies gazeuses, comme agent de contraste ou liquide de préservation d'organes.

## Conclusion

Malgré les progrès significatifs des dix dernières années, il n'existe pas de transporteur d'oxygène utilisable aujourd'hui en clinique comme alternative aux concentrés érythrocytaires. L'efficacité des produits actuellement testés au cours des essais de phase III sera vraisemblablement confirmée. Cependant, leur durée d'action de 6 à 24 heures demeure une limitation. Associés aux différentes techniques d'épargne sanguine périopératoires, transfusion autologue, hémodilution, récupération peropératoire, les transporteurs d'oxygène devraient augmenter la marge de sécurité de l'hémodilution et réduire l'utilisation des produits homologues. Les études cliniques actuellement en cours permettront certainement de déterminer les indications et les modalités d'utilisation de ces solutions

## REFERENCES

1. Amberson WR, Jennings JJ, Rhode CM. Clinical experience with hemoglobin-saline solution. *J Appl Physiol* 1949; 1: 469-89.
2. Savitsky JP, Doczi J, Black J, Arnold JD. A clinical safety trial of stroma-free hemoglobin. *Clin Pharmacol Ther* 1978; 23: 73-80.
3. Azari M, Rohn K, Picken J. Diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb): characterization of the process and the product manufactured under GMP requirements for clinical studies. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994; 22: 701-8.
4. Farmer M, Ebeling A, Marshall T, et al. Validation of virus inactivation by heat treatment in the manufacture of diaspirin crosslinked hemoglobin. *Biomater Artif Cells Immobil Biotechnol* 1992; 20: 429-33.
5. Gould SA, Rosen AL, Sehgal LR, Sehaal HL, Moss GS. Polymerized pyridoxylated hemoglobin: efficacy as an O<sub>2</sub> carrier. *J Trauma* 1986; 26: 903-8.
6. Chatterjee R, Welty EV, Walder RY et al. Isolation and characterization of a new hemoglobin derivative cross-linked between the alpha chains (lysine 99 alpha 1-lysine 99 alpha 2). *J Biol Chem* 1986; 261: 9929-37.
7. Shoemaker SA, Gerber MJ, Evans GL, Archer-Paik LE, Scoggin CH. Initial clinical experience with a rationally designed, genetically engineered recombinant human hemoglobin. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994; 22: 457-65.
8. Hughes GS Jr, Francome SF, Antal EJ, et al. Hematologic effects of a novel hemoglobin-based oxygen carrier in normal male and female subjects. *J Lab Clin Med* 1995; 126: 444-51.
9. Ning J, Anderson PJ, Biro GP. Resuscitation of bled dogs with pyridoxalated-polymerized hemoglobin solution. *Biomater Artif Cells Immobil Biotechnol* 1992; 20: 525-30.
10. Rabinovici R, Rudolph AS, Ligler FS, Yue TL, Feuerstein G. Liposome-encapsulated hemoglobin: an oxygen-carrying fluid. *Circ Shock* 1990; 32: 1-17.
11. Vlahakes GJ, Lee R, Jacobs EE Jr, La Raia PJ, Austen WG. Hemodynamic effects and oxygen transport properties of a new blood substitute in a model of massive blood replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990; 100: 379-88.
12. Przybelski RJ, Malcolm DS, Burris DG, Winslow RM. Cross-linked hemoglobin solution as a resuscitative fluid after hemorrhage in the rat. *J Lab Clin Med* 1991; 117: 143-51.
13. Macdonald VW, Motterlini R. Vasoconstrictor effects in isolated rabbit heart perfused with bis (3, 5 dibromosalicyl) fumarate cross-linked hemoglobin (alpha Hb). *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994; 22: 565-75.
14. Malcolm D, Kissinger D, Garrioch M. Diaspirin cross-linked hemoglobin solution as a resuscitative fluid following severe hemorrhage in the rat. *Biomater Artif Cells Immobil Biotechnol* 1992; 20: 495-7.
15. McKenzie JE, Cost EA, Scandling DM, Savaae RW. Effects of diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) on cardiac function and ECG in the swine. *Biomater Artif Cells Immobil Biotechnol* 1992; 20: 683-7.
16. Bilello K, Schultz S, Powell C, Jaffin J, Cole F, Malcolm D. Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb): control of pressor effect with antihypertensive agents. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994; 22: 819-25.

17. Bush S, Marshall T, Spicuzza J, Nelson D. Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb): bioanalytical studies in swine. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994; 22: 917-
18. Sharma AC, Rebello S, Gulati A. Regional circulatory and systemic hemodynamic effects of diaspirin cross-linked hemoglobin in the rat. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994; 22: 593-602.
19. Sharma AC, Singh G, Gulati A. Role of NO mechanism in cardiovascular effects of diaspirin cross-linked hemoglobin in anesthetized rats. *Am J Physiol* 1995; 269: H1379-88.
20. Gulati A, Rebello S. Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb): involvement of adrenergic mechanisms in the pressor effect. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994; 22: 603- 12.
21. Gulati A, Sharma AC, Singh G. Role of endothelin in the cardiovascular effects of diaspirin crosslinked and stroma reduced hemoglobin. *Crit Care Med* 1996; 24: 137-47.
22. Sharma AC, Gulati A. Yohimbine modulates diaspirin crosslinked hemoglobin induced systemic hemodynamics and regional circulatory effects. *Crit Care Med* 1995; 23: 874-84.
23. Hughes GS Jr, Yancey EP, Albrecht R, et al. Hemoglobin-based oxygen carrier preserves submaximal exercise capacity in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 58: 434-43.
24. Swan SK, Halstenson CE, Collins AJ, Colburn WA, Blue J, Przybelski RJ. Pharmacologic profile of diaspirin cross-linked hemoglobin in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1995; 26: 918-23.
25. Riess JG. Present trends in fluorocarbon based blood substitutes. *Life Support Syst* 1984; 2: 273-6.
26. Riess JG. Fluorocarbon-based oxygen carriers: new orientations. *Artif Organs* 1991; 15: 408-13.
27. Riess JG, Cornelius C, Follana R et al. Novel fluorocarbon based injectable oxygen-carrying formulations with long-term room temperature storage stability. *Adv Exp Med Biol* 1994; 345: 227-34.
28. Cowley HU, Snow FR, Di Sciascio G, Kelly K, Guard C, Nixon JV. Perfluorochemical perfusion during coronary angioplasty in unstable and highrisk patients. *Circulation* 1990, 81: IV 27-34.
29. Riess JG, Dalfors JL, Hanna GK, et al. Development of highly fluid concentrated and stable fluorocarbon emulsions for diagnosis and therapy. *Biomater Artif Cells Immobil Biotechnol* 1992; 20: 839-42.
30. Flaim SF. Pharmacokinetics and side effects of perfluorocarbon-based blood substitutes. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994, 22: 1043-54.
31. Faithfull NS. Oxygen delivery from fluorocarbon emulsions-aspects of convective and diffusive transport. *Biomater Artif Cells Immobil Biotechnol* 1992; 20: 797-804.
32. Spiess BD, Braverman B, Woronowicz AW, Ivonkovich AD. Protection from cerebral air emboli with perfluorocarbons in rabbits. *Stroke* 1986 ; 17: 1146-9.
33. Hirschl RB, Pranikoff T, Wise C, et al. Initial experience with partial liquid ventilation in adult patients with the acute respiratory distress syndrome. *Jama* 1996 ; 275 : 383-9.