

12. Grass JA, Wafa T, Reames A, Wages D, Corash L, Ferrara JLM, Lin L. Prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease by photochemical treatment. *Blood* 1999; 93: 3140-3147.
13. Hornsey VA, Drummond O, Young D, Docherty A, Prowse CV. A potentially improved approach to methylene blue virus inactivation of plasma: the Maco Pharma Moc-Tronic system. *Transfusion Med* 2001; 11: 31-36.
14. Rhenen DJ van, Gullikson H, Cazenave JP, Pamphilon D, Ljungman P, Klueter H, Davis K et al. Therapeutic efficacy and safety of pooled buffy coat platelet concentrates prepared with photochemical pathogen inactivation treatment: the *euroSPRITE* trial. *Blood* 2003; 101: 2426-2433.
15. McCullough J, Vesole D, Benjamin RJ, Slichter S, Pineda A, Snyder EL et al. Pathogen inactivated platelets using Helinx™ technology are haemostatically effective in thrombocytopenic patients: the *SPRINT* trial. *Blood* 2001; 98: 450a.
16. Silberstein LE, Toy P. Research opportunities in Transfusion Medicine. *JAMA* 2001; 285: 577-580.

Summary

Rhenen DJ van. Pathogen reduction of blood products in clinical practice. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2003; 28: 260-263.

The safety of the blood supply is important for a state of the art transfusion treatment. Extensive precautionary measures in the blood banks in the Netherlands have resulted in a small remaining risk of morbidity and mortality through blood products. There are, however, some remaining risks. Although the window phase is narrowed by new test techniques, window donations do still occur. The safety is also limited to the micro-organisms that are represented in the predonation tests. Emerging viruses can evade detection. No test on protozoa is available in blood-bank practice. New techniques have been developed to reduce the potential content of micro-organisms by inactivation in a nucleic acid specific manner. In this way all DNA/RNA-containing micro-organisms, but also leukocytes, are inactivated. Further research has to be done to evaluate the application of these techniques in blood-bank routine and in clinical practice.

Keywords: pathogen reduction, bloodproducts, safety

Ned Tijdschr Klin Chem 2003; 28: 263-267

Hemoglobine-oplossingen: komt het er nog van?

A.J. VERHOEVEN*

Al geruime tijd bestaat de interesse om een alternatief te ontwikkelen voor de klassieke rodebloedceltransfusie. Men heeft hierbij de verwachting dat een dergelijk substituuat goedkoper te produceren is, een langere bewaartijd heeft en het relatief ingewikkelde systeem van kruistypering overbodig maakt. Omdat het nog niet mogelijk is om cellulaire bloedproducten een behandeling te laten ondergaan om eventueel aanwezige pathogenen te inactiveren, wordt ook het punt van veiligheid in dit verband genoemd. Hoewel met het huidige systeem van testen in veel landen het punt van veiligheid nauwelijks nog relevant is, heeft onderzoek in Engeland uitgewezen dat met name professionals in de gezondheidszorg, die verantwoordelijk zijn voor transfusies bij patiënten, toch een farmaceutisch geproduceerd substituuat prefereren boven rode bloedcellen van een willekeurige donor (1). Verder mag in sommige werelddelen door een groeiend percentage besmette donoren een tekort aan veilige bloedproducten worden verwacht, hetgeen

een tweede factor is voor een goede marktverwachting van een te ontwikkelen substituuat. Tenslotte zou een hemoglobine-oplossing kunnen worden toegepast bij patiënten, die op religieuze gronden klassieke bloedtransfusies weigeren.

Ondanks alle kennis over de functie en eigenschappen van hemoglobine (Hb), heeft de industriële ontwikkeling van een veilig en werkzaam alternatief voor rodebloedcelconcentraten (RBC) al meer dan 30 jaar in beslag genomen. Diverse ontwikkelingsprojecten hebben het uiteindelijk niet gehaald, soms pas in een zeer laat stadium (tijdens fase-3-klinische trials), waardoor in totaal tenminste 500 miljoen dollar aan investeringen verloren zijn gegaan. De voornaamste reden hiervan is dat men zich bij het ontwikkelen van rodebloedcelsubstituten heeft gericht op het imiteren van hemoglobine zoals aanwezig in een rode bloedcel, en pas recent duidelijk is geworden dat ook de viscositeit van bloed, de dynamiek van de microcirculatie en de biologie van cellen in de vaatwand een belangrijke rol spelen in de respons op het infunderen van een hemoglobine-oplossing. Opgemerkt dient te worden dat ook pogingen zijn gedaan om een RBC-substituuat te ontwikkelen dat niet is gebaseerd op hemoglobine, maar op organische verbindingen (z.g. perfluorocarbonen) die in staat zijn om een reversibele binding met O₂ aan te gaan. Diverse preklinische en fase-1/2-klinische-studies hebben de potentie van deze benadering laten zien (2-5), maar

**De auteur is hoofd van de afdeling Transfusie Technologie van de Divisie Research van de Stichting Sanquin Bloedvoorziening, Amsterdam. De in dit artikel opgenomen meningen zijn uitsluitend opvattingen van de auteur zelf en weerspiegelen niet het beleid of toekomstverwachting van de stichting Sanquin. De auteur is erkentelijk voor de bijdragen van Dr. J.C. Bakker aan dit manuscript.*

recent is echter de commerciële ontwikkeling van dit product (*Oxygent*TM van de firma Alliance) stopgezet, wederom na verdachte resultaten in een fase-3-klinische-trial.

Binnenkort lijken er echter toch één of twee RBC-substituten beschikbaar te komen gemaakt uit hemoglobine, en dus lijkt het zinvol een overzicht te geven van de factoren, waarmee rekening moet worden gehouden bij het veilig toedienen van een hemoglobine-oplossing. Al deze factoren hebben direct of indirect te maken met het verwijderen van de natuurlijke erytrocytenomgeving van hemoglobine.

Stabiliteit van hemoglobine

Het eerste obstakel bij het toepassen van hemoglobine-oplossingen vormde de verontreiniging met restjes erytrocytenmembraan (stroma). In de 70-er jaren is echter in een fase-1-klinische-trial gebleken dat ook een stromavrije hemoglobine-oplossing bij mensen nierschade induceert (6). Dit is toegeschreven aan het uiteenvallen van de Hb-tetrameer in 2 dime- ren, die door de nier worden uitgescheiden maar daar ook gedeeltelijk neerslaan. Alle procedures, die vervolgens zijn geprobeerd om een hemoglobine-oplossing voor klinische toepassing te maken, bevatten naar aanleiding van deze observatie een stap om de sub- units van de tetrameer aan elkaar te koppelen (intra- moleculaire crosslinking (7)) of een stap om Hb- tetrameren aan elkaar te koppelen: intermoleculaire crosslinking. Hoewel dit laatste vooral werd gedaan met als doel het verlengen van de verblijftijd, is recent duidelijk geworden dat voor een hemoglobine-oplos- sing zonder bijwerkingen het een absolute voorwaarde is dat Hb-tetrameren (met een moleculair gewicht van 64 kD) niet meer aanwezig zijn en intermoleculaire crosslinking dus noodzakelijk is (zie verder).

Affiniteit voor O₂

Een bekend probleem van het in oplossing brengen van hemoglobine betreft het verlies van binding van de allosterische regulator 2,3-DPG, waardoor de affiniteit voor O₂ toeneemt. In de praktijk spreekt men van een verlaging van de p50 (de partiele O₂-spanning waar- bij de hemoglobine half-maximaal verzadigd is met zuurstof) van ongeveer 28 mm Hg naar 9 mm Hg. De verwachting was dat door deze affiniteitstoename bij een veneuze pO₂ van ongeveer 40 mm Hg het afstaan van zuurstof aan de weefsels niet meer goed kon plaatsvinden. Om deze reden heeft men in de 70- en 80-er jaren van de vorige eeuw het celvrije hemoglo- bine modificaties laten ondergaan, waardoor de af- finiteit voor O₂ weer afneemt en in de fysiologische range wordt gebracht. Een voorbeeld hiervan is de behandeling met pyridoxaalfosfaat gevolgd door re- ductie, waardoor de 2,3-DPG-bindingsplaats covalent wordt gemodificeerd.

Op basis van theoretische overwegingen, ondersteund door resultaten van proefdierexperimenten (8), hou- den de meeste onderzoekers overigens tegenwoordig niet meer vast aan het totstandbrengen van een p50 dicht bij de fysiologische waarde. De reden hiervoor is dat niet alleen de affiniteit voor zuurstof belangrijk wordt geacht voor de zuurstofafgifte aan de weefsels,

maar ook de snelheid van “off-loading”. Deze snel- heid is voor een niet-gemodificeerd hemoglobine in oplossing vele malen groter dan voor een vergelijk- baar hemoglobine in een rode bloedcel, waardoor bij perfusies met hemoglobine-oplossingen problemen kunnen ontstaan, waarschijnlijk door autoregulatie- mechanismen in de microcirculatie. Een ander voor- deel van een hoge affiniteit voor O₂ zou kunnen zijn dat juist in gebieden met een zeer lage zuurstofspan- ning afgifte van zuurstof plaatsvindt. Het is opvallend dat er in het veld geen overeenstemming bestaat over wat de optimale p50 zou moeten zijn. In de twee op- lossingen, die nu het dichtst bij grootschalige toepas- sing zijn (zie verder), is in het ene geval sprake van een p50 vergelijkbaar met de fysiologische waarde, in het andere geval van een verhoging. In een recent ont- wikkelde hemoglobine-oplossing is zelfs een waarde onder de 9 mm Hg nagestreefd (9). Een gunstig effect van een verlaging of een verhoging van de p50 zou zelfs kunnen afhangen van het op te lossen probleem: persisterende anemie, hypoxie door onvoldoende oxy- genatie of beperkte bloedtoevoer (10).

Hemoglobine als katalysator van oxidatiereacties

Een tweede consequentie van het verwijderen van he- moglobine uit de erytrocyt is het verlies van diverse anti-oxidatieve mechanismen (NADPH- en GSH- afhankelijke reductases, catalase, superoxide-dismu- tase). Hierdoor neemt de kans op de vorming van geoxideerd hemoglobine (met-Hb) sterk toe. Nog be- langrijker in een omgeving zonder reductiemogelijk- heden is de reactie van de heemgroep met biologische peroxides (H₂O₂, lipideperoxide, peroxy-nitriet) waarbij hemoglobine als peroxidase optreedt en di- recte cytotoxische effecten kan veroorzaken (11). Om deze oxidatieve nevenreacties te vermijden, wordt door een aantal groepen hemoglobine gekoppeld aan superoxide-dismutase en catalase (12). In Japan wordt getracht dit probleem (en het probleem van p50-verschuiving) te voorkomen door hemoglobine in te sluiten in liposomen samen met homocysteïne als reductor en pyridoxaalfosfaat (13), hetgeen dus neerkomt op het farmaceutisch imiteren van rode bloedcellen (“Neo Red Cells”). Tot op heden zijn deze experimentele producten niet in fase-3-klinische trials getest.

Binding van NO door hemoglobine

Het belangrijkste probleem, dat zich heeft voorge- daan bij het testen van diverse experimentele hemo- globine-oplossingen, is de waargenomen stijging van de bloeddruk. Aanvankelijk werd dit door sommige onderzoekers in het veld als een voordeel gezien (bij- voorbeeld in een situatie van veel bloedverlies), maar de resultaten van diverse trials hebben anders uit- gewezen. De bloeddrukstijging onder invloed van Hb-oplossingen werd pas goed begrepen na de ophel- dering van de belangrijke rol die NO (stikstof- monoxide) speelt in de regulatie van de bloeddruk. NO, geproduceerd in de endotheelcellen van de vaat- wand, heeft een relaxerende werking op onderlig- gende gladde spiercellen, waardoor NO als fysiologi- sche vaatverwijder bekend is geworden. NO heeft

echter ook een hoge affiniteit voor de heemgroepen in hemoglobine en hemoglobine kan dus fungeren als NO-scavenger, waardoor vasoconstrictie optreedt. Problemen veroorzaakt door NO-scavenging zijn hoogstwaarschijnlijk de onderliggende oorzaak, waardoor de ontwikkeling van HemAssist™ (door de firma Baxter) en zeer recent ook van Hemolink™ (door de firma Hemosol) in fase-3-klinische-trials is stopgezet.

Recent onderzoek laat zien dat het probleem van bloeddrukstijging minder groot is naarmate de moleculaire dimensie van het gemanipuleerde hemoglobine groter wordt gemaakt (14). Men kan dit bereiken door hemoglobine intermoleculair te crosslinken met behulp van glutaraldehyde (Poly-Hb), door behandeling met poly-ethyleenglycol (PEG), door koppeling van hemoglobine aan zetmeelpolymeren (hydroxyethylstarch, HES) of door insluiting van hemoglobine in liposomen. Gesuggereerd wordt dat de inverse correlatie tussen molecuulgrootte en bloeddrukstijging veroorzaakt wordt door een afname van de mogelijkheid voor hemoglobine om de endotheelcellen te passeren (verminderde extravasatie), waardoor de interferentie met de fysiologische NO-regulatie minder sterk is. Het is evident dat extravasatie van hemoglobine typisch een probleem is dat verbonden is aan het infunderen van een hemoglobine-oplossing, omdat intacte erythrocyten niet of nauwelijks migreren over intact endotheel. Polymerisatie van hemoglobine (of insluiting in een liposoom) om dit te imiteren heeft dus twee voordelen: minder vaatvernauwing en een langere verblijftijd.

De verblijftijd van gepolymeriseerd hemoglobine blijft overigens vele malen korter dan van geïnfundeerde erythrocyten. Bij ratten bedraagt deze, afhankelijk van het preparaat, 12 tot 24 uur. Over de verblijftijd bij mensen zijn nog weinig exacte gegevens bekend, maar deze kan worden geschat op ten hoogste 2-3 dagen, waardoor toepassing van hemoglobine-oplossingen beperkt zal blijven tot het beheersen van crisissituaties.

Door sommige onderzoekers wordt geprobeerd de negatieve ervaringen met NO-binding door geïnfundeerde hemoglobine-oplossingen juist positief te gebruiken. De redenering hierbij is dat met name patiënten met septische shock zouden kunnen profiteren van de infusie van een hemoglobine-oplossing, omdat men vermoedt dat hierbij overproductie van NO een belangrijke rol speelt (15). Toch kunnen vraagtekens worden gezet bij deze benadering, omdat juist in septische shock blokkade van de microcirculatie wordt waargenomen (16) en extra NO de microvasculaire doorbloeding kan herstellen (17). De dynamiek van de microcirculatie en de effecten van hemoglobine-oplossingen hierop zijn recente gebieden van onderzoek, die van groot belang zijn voor het optimaliseren van rodebloedcelsubstituten (18).

Een andere klinische situatie waarbij scavenging van NO juist voordelen zou bieden, is de z.g. reperfusieschade, die ontstaat na het perfunderen van weefsels die lang zonder zuurstof zijn geweest. Recent zijn gunstige effecten gerapporteerd van remming van NO-synthese in een rattenmodel van reperfusieschade (19).

Sommige onderzoekers hebben de les van NO-binding door hemoglobine-oplossingen nog verder geïnterpreteerd door een hemoglobinederivaat te ontwikkelen, dat in staat is tot afgifte van NO. Dit wordt bereikt door NO te binden aan het cysteïneresidu 93 van de β -keten (leidend tot de vorming van S-nitroso-Hb). Deze binding blijkt te kunnen fungeren als bron voor NO. De vaatvernauwing door infusie van ongemodificeerd hemoglobine kan aldus worden voorkomen (20).

In de literatuur wordt een stevige discussie gevoerd over de rol die S-nitroso-Hb speelt in de normale regulatie van bloedvatverwijding door *intacte* erythrocyten. Door de groep van Stamler (21) is gepostuleerd dat NO onder fysiologische condities niet alleen kan binden aan de heemgroepen van hemoglobine (leidend tot de vorming van nitrosyl-Hb), maar ook aan Cys-93 van de β -keten (leidend tot de vorming van S-nitroso-Hb). Deze binding van NO aan cysteïne zou zodanig gereguleerd worden door de toestand van de heemgroep, dat onder hypoxische condities niet alleen zuurstof wordt losgelaten, maar ook NO. Dit leidt tot de op zich aantrekkelijke hypothese dat in hypoxische weefsels niet alleen zuurstof wordt afgegeven, maar er ook vaatverwijding optreedt resulterend in meer bloedtoevoer. Door de groep van Schechter (22) is echter gevonden dat nitrosyl-Hb wel kan worden gedetecteerd, maar S-nitroso-Hb nauwelijks, zelfs niet na inademen van NO. Daarbij moet ook nog worden bedacht dat NO wel gemakkelijk rode bloedcellen binnenkomt, maar er niet makkelijk meer uitkomt. Deze discussie is relevant voor hemoglobine-oplossingen, omdat mochten Stamler c.s. gelijk hebben en er dus een belangrijke rol is weggelegd voor interactie tussen O₂-binding door de heemgroep en de afgifte van NO door Cys-93, deze regulatie in een substituuat eigenlijk aanwezig zou moeten zijn om de fysiologische functie van een rode bloedcel ook in dit opzicht te imiteren.

Viscositeit van hemoglobine-oplossingen

Voor een ieder met enige ervaring op een transfusielaboratorium is het een bekend gegeven dat met het lyseren van erythrocyten niet alleen de transparantie van de suspensie toeneemt, maar ook de vloeibaarheid. Zonder modificaties is de viscositeit van een hemoglobine-oplossing dus aanzienlijk lager dan van een erythrocytensuspensie met een vergelijkbaar Hb-gehalte en dit verschil is eveneens bij de klinische toepassing van hemoglobine-oplossingen niet op de juiste waarde geschat. Bijna 10 jaar geleden waren al aanwijzingen gevonden dat met name endotheelcellen, die de grens vormen tussen bloedvat en onderliggend weefsel, een zeer fijne sensor zijn van de viscositeit van het langsstromend bloed (23). Veranderingen in viscositeit worden op het oppervlak gedetecteerd als een veranderde shear stress, waarna signalering optreedt en de afgifte van biologische mediators (NO, prostacycline, endothelin) wordt beïnvloed. Deze mediators hebben o.a. invloed op de bloeddruk, dus voor het vermijden van deze respons is het van belang dat een toe te dienen hemoglobine-oplossing qua viscositeit niet te veel verschilt van normaal bloed.

Ontwikkelingen op de markt

Zoals reeds opgemerkt in de inleiding van dit stuk, dienen zich binnenkort RBC-substituten aan op de markt, die bereid zijn uit hemoglobine. De twee belangrijkste kandidaten zijn Polyheme[®] (van de firma Northfield Laboratories) en Hemopure[®] (van de firma Biopure). Polyheme[®] wordt bereid uit humaan hemoglobine na behandeling met pyridoxaalfosfaat en crosslinking met glutaraldehyde en heeft een p50 tussen de 16 en 20 mm Hg. De resultaten van enkele fase-3-klinische-trials zijn gepubliceerd (24, 25), een derde klinische trial voor toepassing bij eerste hulp aan zwaargewonde patiënten is in voorbereiding. De effecten van Polyheme[®] op bloeddruk in diermodellen of patiënten zijn niet echt bekend, mede omdat dit product nauwelijks door onafhankelijke onderzoekers wordt onderzocht.

Hemopure[®] wordt bereid uit runderhemoglobine, dat van nature een hogere p50 heeft dan humaan hemoglobine, en eveneens wordt gepolymeriseerd door glutaraldehydebehandeling. Hemopure[®] leidt zowel in diermodellen als patiënten tot een geringe bloeddrukstijging (26), maar deze wordt door de betrokken onderzoekers aanvaardbaar geacht. De cytotoxische effecten van Hemopure[®] zijn duidelijk kleiner dan van andere (mislukte) hemoglobine-oplossingen, waarschijnlijk door de grotere stabiliteit van de heemgroep (27). Dit product is in diverse landen voor veterinaire toepassingen inmiddels op de markt en in Zuid-Afrika is Hemopure[®] sinds vorig jaar zelfs toegelaten voor gebruik bij mensen. In dit land speelt het reeds gemereerde probleem van het (tijdig) vinden van virusnegatief bloed. Door het Amerikaanse Congres is recent een geormerkte subsidie verstrekt voor onderzoek naar toepassing van Hemopure[®] in de traumazorg van militairen. Op dit moment vinden discussies plaats met de FDA over toelating van Hemopure[®] op de Amerikaanse markt met als eerste toepassing de ondersteuning van orthopedische operaties.

Slotopmerkingen

Ondanks, maar waarschijnlijk dankzij, dure mislukkingen bij de ontwikkeling van een veilig substituuat voor de klassieke rodebloedceltransfusie, komen er op afzienbare termijn één of meerdere hemoglobine-oplossingen beschikbaar voor toepassing bij gedefinieerde patiëntengroepen. Hierbij moet in eerste instantie worden gedacht aan patiënten die bloedtransfusies weigeren op religieuze gronden en aan patiënten die orthopedische operaties moeten ondergaan. Toepassing bij individuele patiënten om crisis-situaties het hoofd te bieden zal meer en meer plaatsvinden. Indien succesvol, ligt toepassing van hemoglobine-oplossingen in andere gebieden (b.v. traumazorg) in de lijn der verwachting. Toepassing bij patiënten met septische shock lijkt voorlopig niet aan de orde vanwege de ingewikkelde interactie met de sterk veranderde microcirculatie. Kritische punten blijven de beschikbaarheid van (veilige) grondstof voor de bereiding van hemoglobine-oplossingen en de relatief korte verblijftijd na toediening.

Literatuur

1. Lowe KC, Farrell K, Ferguson EM, James V. Current perceived risks of transfusion in the UK and relevance to the future acceptance of blood substitutes. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2001; 29: 179-189.
2. Wahr JA, Trouwborst A, Spence RK, Henny CP, Cernaianu AC, Graziano GP, Tremper KK, Flaim KE, Keipert PE, Faithfull NS, Clymer JJ. A pilot study of the effects of a perflubron emulsion, AF 0104, on mixed venous oxygen tension in anesthetized surgical patients. *Anesth Analg* 1996; 82: 103-107.
3. Habler OP, Kleen MS, Hutter JW, Podtschaske AH, Tiede M, Kemming GI, et al. Hemodilution and intravenous perflubron emulsion as an alternative to blood transfusion: effects on tissue oxygenation during profound hemodilution in anesthetized dogs. *Transfusion* 1998; 38: 145-155.
4. Spahn DR, Brempt R van, Theilmeier G, Reibold JP, Welte M, Heinzerling H, et al. Perflubron emulsion delays blood transfusions in orthopedic surgery. *European Perflubron Emulsion Study Group. Anesthesiology* 1999; 91: 1195-1208.
5. Hill SE, Leone BJ, Faithfull NS, Flaim KE, Keipert PE, Newman MF. Perflubron emulsion (AF0144) augments harvesting of autologous blood: a phase II study in cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2002; 16: 555-560.
6. Savitsky JP, Doczi J, Black J, Arnold JD. A clinical safety trial of stroma-free hemoglobin. *Clin Pharmacol Ther* 1978; 23: 73-80.
7. Bleeker WK, van der Plas J, Agterberg J, Rigter G, Bakker JC. Prolonged vascular retention of a hemoglobin solution modified by cross-linking with 2-nor-2-formylpyridoxal 5'-phosphate. *J Lab Clin Med* 1986; 108: 448-455.
8. Vaslef SN, Kaminski BJ, Talarico TL. Oxygen transport dynamics of acellular hemoglobin solutions in an iso-volemic hemodilution model in swine. *J Trauma* 2001; 51: 1153-1160.
9. Vandegriff KD, Malavalli A, Wooldridge J, Lohman J, Winslow RM. MP4, a new nonvasoactive PEG-Hb conjugate. *Transfusion* 2003; 43: 509-516.
10. Bakker JC. 2,3-Diphosphoglycerate, Haemoglobin and O₂ Release to Tissues. *Academisch proefschrift, Universiteit van Amsterdam, 1977.*
11. Yeh LH, Alayash AI. Redox side reactions of haemoglobin and cell signalling mechanisms. *J Intern Med* 2003; 253: 518-526.
12. D'Agnillo F, Chang TM. Polyhemoglobin-superoxide dismutase-catalase as a blood substitute with antioxidant properties. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 667-671.
13. Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, Ikeda E, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. *Am J Pathol* 2001; 159: 1079-1088.
14. Sakai H, Hara H, Yuasa M, Tsai AG, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M. Molecular dimensions of Hb-based O(2) carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H908-915.
15. Privalle C, Talarico T, Keng T, DeAngelo J. Pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene: a nitric oxide scavenger with antioxidant activity for the treatment of nitric oxide-induced shock. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1507-1517.
16. Ince C, Sinaasappel M. Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. *Crit Care Med* 1999; 27: 1369-1377.
17. Spronk PE, Ince C, Gardien MJ, Mathura KR, Oudemans-van Straaten HM, Zandstra DF. Nitroglycerin in septic shock after intravascular volume resuscitation. *Lancet* 2002; 360: 1395-1396.

18. Intaglietta M. Microcirculatory basis for the design of artificial blood. *Microcirculation* 1999; 6: 247-258.
19. Zhang L, Looney CG, Qi WN, Chen LE, Seaber AV, Stamler JS, Urbaniak JR. Reperfusion injury is reduced in skeletal muscle by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Appl Physiol* 2003; 94: 1473-1478.
20. Nakai K, Togashi H, Yasukohchi T, Sakuma I, Fujii S, Yoshioka M, Satoh H, Kitabatake A. Preparation and characterization of SNO-PEG-hemoglobin as a candidate for oxygen transporting material. *Int J Artif Organs* 2001; 24: 322-328.
21. Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Piantadosi CA. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 1997; 276: 2034-2037.
22. Gladwin MT, Ognibene FP, Pannell LK, Nichols JS, Pease-Fye ME, Shelhamer JH, Schechter AN. Relative role of heme nitrosylation and beta-cysteine 93 nitrosation in the transport and metabolism of nitric oxide by hemoglobin in the human circulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9943-9948.
23. Kuchan MJ, Jo H, Frangos JA. Role of G proteins in shear stress-mediated nitric oxide production by endothelial cells. *Am J Physiol* 1994; 267: C753-758.
24. Gould SA, Moore EE, Hoyt DB, Burch JM, Haenel JB, Garcia J, et al. The first randomized trial of human polymerized hemoglobin as a blood substitute in acute trauma and emergent surgery. *J Am Coll Surg* 1998; 187: 113-120.
25. Gould SA, Moore EE, Hoyt DB, Ness PM, Norris EJ, Carson JL, et al. The life-sustaining capacity of human polymerized hemoglobin when red cells might be unavailable. *J Am Coll Surg*. 2002; 195: 445-452.
26. Levy JH, Goodnough LT, Greilich PE, Parr GV, Stewart RW, Gratz I, et al. Polymerized bovine hemoglobin solution as a replacement for allogeneic red blood cell transfusion after cardiac surgery: results of a randomized, double-blind trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 124: 35-42.
27. Baldwin AL, Wiley EB, Alayash AI. Comparison of effects of two hemoglobin-based O(2) carriers on intestinal integrity and microvascular leakage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H1292-301.

Ned Tijdschr Klin Chem 2003; 28: 267-274

Ontwikkeling van moleculaire diagnostiek van bloedgroepen binnen de bloedbank

P.A. MAASKANT-van WIJK¹ en G.H.M. GROOTKERK-TAX^{1,2}

De ontwikkeling van moleculair-biologische technieken heeft het mogelijk gemaakt de genetische achtergrond van veel bloedgroepsystemen te ontrafelen. Dit betekent dat het nu mogelijk is om op DNA-niveau te typeren voor een bloedgroep en het fenotype te voorspellen. Binnen de dagelijkse praktijk van de bloedtransfusie wordt het genotyperen steeds vaker gebruikt. Vooral wanneer het serologisch lastig is om een bloedgroep te bepalen, zoals in geval van multitransfusees, onbetrouwbare of zeldzame antisera of varianten, kan DNA-typering uitkomst bieden.

Veel van de huidige DNA-typeertesten zijn gebaseerd op de kaukasische bevolking terwijl steeds duidelijker wordt dat er binnen de bloedgroepsystemen een grote etnische variabiliteit bestaat. Daarom vereist het typeren op DNA-niveau een uitgebreide kennis van de genen die coderen voor bloedgroepsystemen in verschillende bevolkingsgroepen. De polymerase chain reaction (PCR) assay die nu gebruikt wordt voor het typeren van RhC en Rhc is een voorbeeld van een test die wij recent hebben aangepast voor typeren in een multiraciale samenleving.

De ontwikkeling van de moleculair-biologische technieken en de groeiende kennis omtrent etnische va-

riabiliteit maken dat genotyperen leidt tot betrouwbare voorspellingen van het fenotype. Hierdoor ontstaat de behoefte aan technieken die grotere aantallen monsters kunnen verwerken. Deze technieken zijn nu volop in ontwikkeling. Op dit moment wordt de Pyrosequencing-techniek in de praktijk getoetst en vergeleken met allelische discriminatie met behulp van real-time PCR (Taqman-techniek) wat betreft betrouwbaarheid, kosteneffectiviteit en snelheid. Tevens wordt gewerkt aan de ontwikkeling van een bloedgroepenchip in zowel nationaal als Europees verband. Omdat met deze technieken veel donoren/patiënten voor veel bloedgroepsystemen tegelijk getypeerd kunnen worden, zal het genotyperen in de transfusiepraktijk waarschijnlijk een steeds grotere plaats gaan innemen.

Trefwoorden: genotypering, bloedgroepsysteem, transfusie

Op de celmembranen van de humane erythrocyt komen meer dan 270 bloedgroepantigenen tot expressie. Deze bloedgroepantigenen behoren toe aan 26 erkende bloedgroepsystemen. Elk bloedgroepsysteem wordt gecodeerd door een enkel gen of door een cluster van twee of drie zeer homologe genen. De meeste van deze genen zijn inmiddels gekloneerd en de sequenties zijn bekend. Door van bloeddonoren met verschillende fenotypen de genen in kaart te brengen, is duidelijk geworden wat de genetische achtergrond is van de verschillende bloedgroepantigenen. Hier-

Sanquin Bloedbank Regio Zuidwest, Rotterdam¹ en Sanquin Research at CLB, Amsterdam²

Correspondentie: P.A. Maaskant-van Wijk, Sanquin Bloedbank Regio Zuidwest, Wijtamaweg 10, 3015 CN Rotterdam. E-mail: petra.maaskant@bloodrtd.nl