

## STVARANJE HEMIGLOBINA SUŠENJEM KRVI III UTJECAJ RAZNIH FAKTORA NA BRZINU STVARANJA HEMIGLOBINA

DUŠANKA MIKAC-DEVIĆ

*Bolnica Dra M. Stojanovića, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*

*(Primljeno 18. VII 1964)*

Reakcija stvaranja hemiglobina za vrijeme sušenja krvi opisana je već prije (1). Isto tako su ispitani uslovi i tok ove reakcije u krvi čovjeka i nekih životinja (2). Ovdje je ispitan utjecaj nekih kemijskih agensa na tok ove reakcije. Tako je ispitan utjecaj nekih fenola i amina, zatim anorganskih soli, organskih boja i nekih redukcionih sredstava. Utjecaj nije uvijek isti kao kod djelovanja *in vivo*. Tako metilensko modrilo i u prisustvu askorbinske kiseline djeluje katalitički. Fenoli i amini, koji su izrazita sredstva za redukciju, djeluju kao katalizatori stvaranja hemiglobina. Nastojalo se naći objašnjenje za te pojave. Ispitivanjem kinetike te reakcije vidi se da je reakcija prvog reda, tj. dana sredstva samo kataliziraju ili inhibiraju osnovni proces.

U krvi *in vitro* hemoglobin prelazi polagano u hemiglobin. Ovaj se prelaz normalno dešava i u krvi koja cirkulira, ali fermentni sistemi u eritrocitima vrše odmah redukciju nastalog hemiglobina, tj. ne dozvoljavaju da se on stvara u većim količinama (3). *Eggleton* i *Fegler* (4) su našli da je stvaranje hemiglobina ubrzano ako je uklonjena stroma. To je zbog toga što stroma sadržava tvari koje stvaraju mehanizam koji uvjetuje optimalnu koncentraciju reduciranog glutationa, a on je jedan od važnih faktora zaštite hemoglobina od oksidacije. Važnu ulogu igraju i organski fosfati (5).

Jedan od uzroka stvaranja hemiglobina u organizmu je djelovanje nekih kemijskih spojeva. Postoji velik broj spojeva koji imaju takvo djelovanje (3, 6), a najznačajnije grupe jesu  $-\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}^-_2$ ,  $-\text{NO}$ ,  $-\text{NH}_2$  (5). Obzirom na oksidoredukcijski potencijal, malo tih tvari može djelovati direktno; one djeluju tek nakon nekih promjena. Tako je djelovanje aromatskih amino i nitro spojeva rezultat prelaza u aminofenole, a zatim u odgovarajuće kinone koji su oksidirajuće supstancije. Međutim, prema drugoj pretpostavci, ovi kemijski agensi inhibiraju sistem koji normalno reducira stvoreni hemiglobin u krvi.



Djelovanje jednog istog spoja na hemiglobin u smislu prelaza u hemiglobin različito je *in vivo* i *in vitro*. Supstancije koje *in vitro* stvaraju hemiglobin dodane krvi koja cirkulira ne moraju djelovati i mogu se izlučiti bez efekta, jer ne prodiru u eritrocite. Tako kalijev fericijanid *in vitro* promptno oksidira sav hemoglobin u hemiglobin dok *in vivo* nema djelovanja.

Jedan od načina nastajanja hemiglobina *in vitro* jest taj da se krv u obliku krvnih mrlja osuši na zraku (1). Ovdje je obrađeno ponašanje i utjecaj raznih dodanih tvari u toj reakciji: da li se njihovo djelovanje mnogo razlikuje od djelovanja tih spojeva u cirkulirajućoj krvi. Dobiiveni rezultati gledani sa jednog drugog aspekta mogu koristiti u promatranju sličnih procesa *in vivo*.

## MATERIJAL I METODA

Metoda i način na koji se ispitivao stvoreni hemiglobin opisani su već prije (1, 2).

Spojevi koji su dodani krvi da bi djelovali na stvaranje hemiglobina mogu se svrstati u nekoliko grupa. Tako su u prvoj grupi obuhvaćeni fenoli i amini, zatim neke anorganske soli, te organske boje i neka redukciona sredstva. Koncentracija dodanih supstancija u pokusima iznosila je: 0,02%, 0,05%, 0,07%, 0,1%, 0,2%, 0,5%, 0,7%, 1%, 2% i 4%. Uza svaku seriju promatranja djelovanja dodatnih tvari u svrhu komparacije, postavljena je serija s istom krvi bez dodatnih tvari. Prvi uzorak je odmah analiziran, a dalji uzorci za svakih 20 minuta u periodu vremena od 4 sata. Kod rada s grupom organskih boja koncentracije su priređene na ovaj način: 0,05% boje otopilo se u 0,9% otopini NaCl. Na 20 ml krvi dodalo se te otopine 0,2 ml, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4 i 5 ml. Kontrolnoj seriji se dodao isti volumen fiziološke otopine NaCl kako bi se dobilo isto razrjeđenje.

## REZULTATI

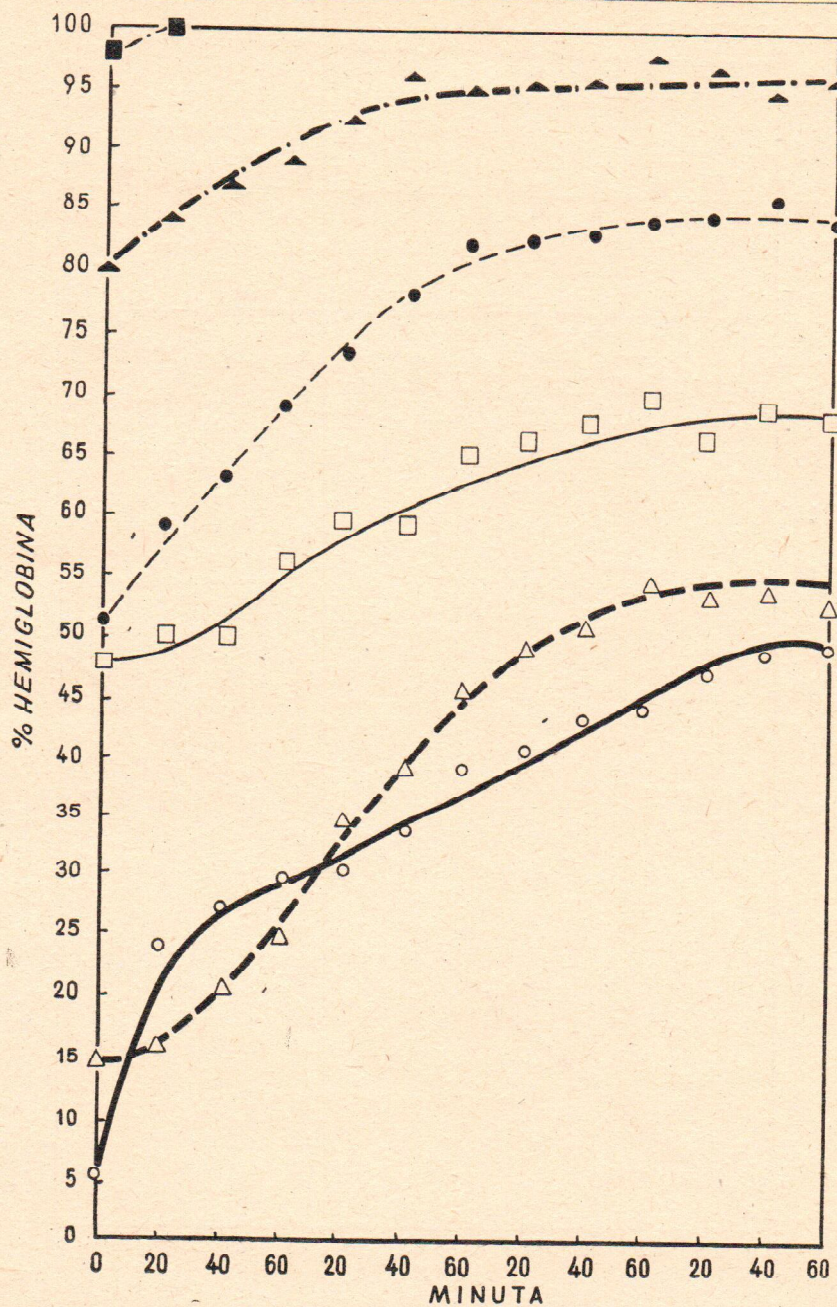
### *Fenoli i amini*

Od ove grupe spojeva ispitano je djelovanje hidrokinona, rezorcina, metola, fenola, pirogalola i anilina.

Hidrokinon izrazito katalizira stvaranje hemiglobina i već u koncentraciji od 0,2% za 20 minuta prevodi sav hemoglobin u hemiglobin (slika 1).

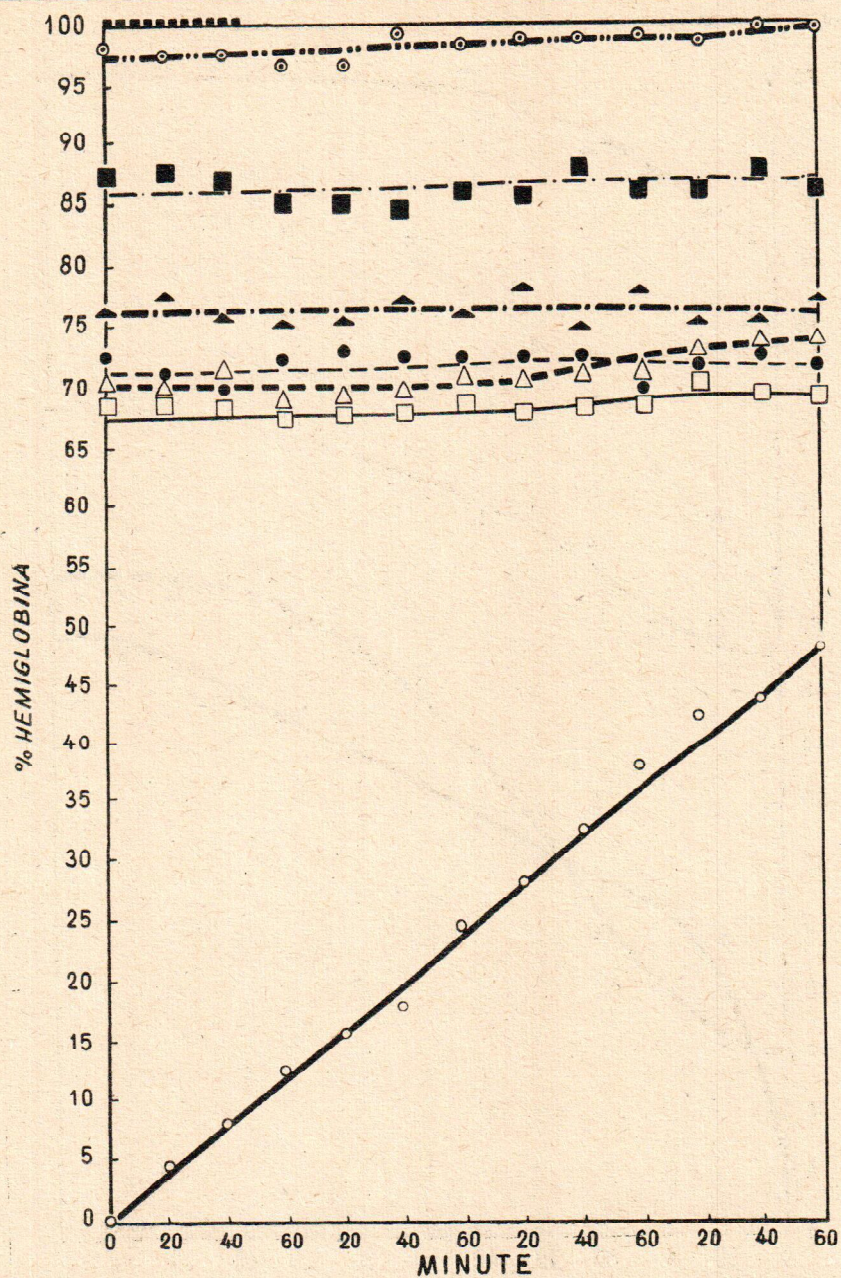
Rezorcin u nižim koncentracijama ne djeluje značajnije dok u koncentracijama većim od 0,2% inhibira stvaranje hemiglobina. Samo u koncentraciji od 4% rezorcin se ponaša tako da njegovo djelovanje odudara od tog zaključka. Međutim, i u nekim pokusima sa drugim dodatnim





Sl. 1. Stvaranje hemiglobina u prisustvu hidrokinona. Kontrolni uzorak (o), krv sa 0.02% (Δ), 0.05% (□), 0.07% (●), 0.10% (▲) i 0.20% (■) hidrokinona.





Sl. 2. Stvaranje hemiglobina u prisustvu metola. Kontrolni uzorak (o), krv sa 0.02% (Δ), 0.05% (□), 0.07% (●), 0.10% (▲), 0.20% (■), 0.50% (⊙) i 0.70% (—) metola.



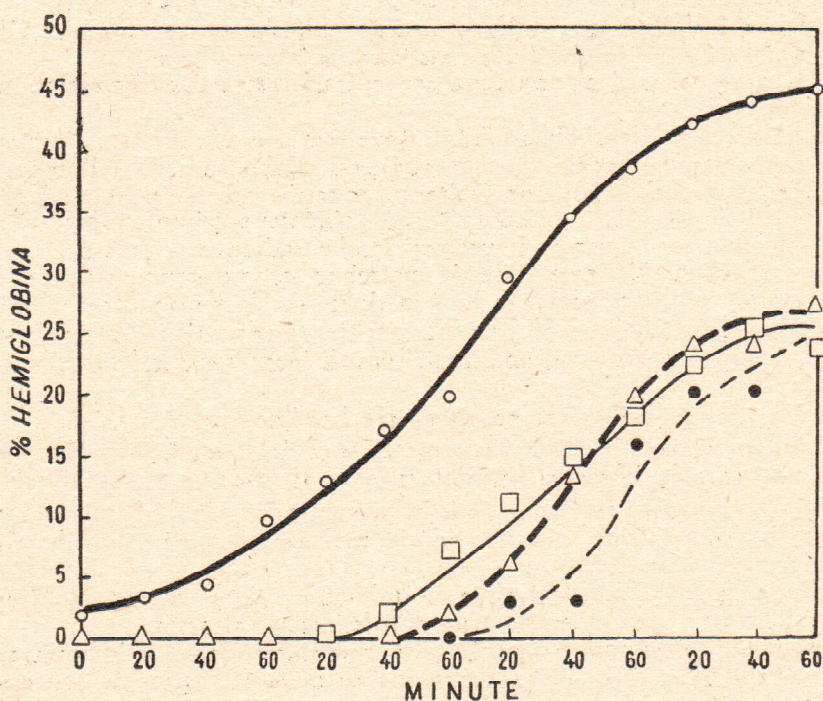
tvarima ponašanje supstancija dodanih u koncentraciji većoj od 1% razlikuje se od djelovanja u manjim količinama. To možemo tumačiti time da su te koncentracije prevelike a da bismo supstanciju u toj količini mogli smatrati katalizatorom.

Metol je dodan krvi samo do koncentracije od 0,7%, jer je već dodatkom te koncentracije došlo do potpunog prelaza hemoglobina u hemoglobin (slika 2). Metol djeluje kao izraziti katalizator oksidacije hemoglobina i njegovo je djelovanje snažnije nego djelovanje hidrokinona. Tok krivulja s metolom je potpuno drugačije negoli kod drugih ispitanih tvari. Koncentracija hemoglobina na početku pokusa ostaje skoro jednaka u sva četiri sata sušenja.

Fenol ne djeluje ni kao izraziti katalizator ni kao inhibitor.

Piragalol kao dodatna supstancija djeluje izrazito u smislu katalize stvaranja hemoglobina i dodan u koncentraciji od 2% u periodu od jednog sata prevodi sav hemoglobin u hemoglobin.

Anilin, predestiliriran neposredno prije rada dodavan je do koncentracije od 0,5%. Iako su spojevi s aminoskupinom poznati kao stvaraoci hemoglobina *in vivo*, u našim ispitivanjima s anilinom to nije bio slučaj.



Sl. 3. Stvaranje hemoglobina u prisustvu kalijeva rodanida. Kontrolni uzorak (○), krv sa 0.02 (△), 0.05% (□) i 0.07% (●) kalijeva rodanida.



### *Anorganske soli*

Od anorganskih soli ispitali smo djelovanje kalijeva rodanida, kalijeva bromida i kalijeva jodida, ali u njihovu ponašanje nije zapažena nikakva pravilnost.

Kalijev rodanid inhibira oksidaciju hemoglobina, osim u vrlo visokim koncentracijama. Na slici 3 prikazan je tok krivulja samo u nekim koncentracijama.

Inhibirajuće djeluje i kalijev bromid, ali samo u koncentraciji od 0,05%, 0,1% i 0,2%. Inače ne djeluje značajnije.

Djelovanje kalijeva jodida mijenja se s promjenom koncentracije: u niskim koncentracijama ne djeluje značajnije, u srednjim katalizira, a u koncentracijama većim od 1% inhibira stvaranje hemoglobina.

### *Organske boje*

Ispitali smo djelovanje slijedećih boja na reakciju stvaranja hemoglobina pri sušenju krvi: rodamina B, eozina, bengalske roze, tionina, janusova zelenila, briljantalizarinskog modrila, indigo sulfonatskog natrija, toluidinskog modrila i metilenskog modrila. Djelovanje metilenskog modrila obrađeno je samo i zajedno s askorbinskom kiselinom.

Rodamin B djeluje u svim koncentracijama (osim najveće: 5 ml 0,5% boje na 20 ml krvi) inhibirajuće na stvaranje hemoglobina.

Dodavanje eozina krvi povećava koncentraciju stvorenog hemoglobina sušenjem.

Bengalska roza djeluje kao inhibitor ove reakcije. Na slici 4 prikazana je reakcija samo u nekim koncentracijama. Kako su neki od pokusa djelovanja organskih boja na ispitanu reakciju rađeni za ljetne žege, kad je temperatura bila znatno viša od uobičajene sobne temperature, to i kontrolna serija u prvom uzorku sadržava određeni postotak hemoglobina. Vrijeme koje je potrebno za pripremu krvi prije spektrofotometrijskog mjerenja bilo je dovoljno da se oksidirao jedan dio hemoglobina. U tu svrhu analizirano je zajedno nekoliko uzoraka krvi, koji su svi već u prvoj analizi sadržavali jednu veću količinu hemoglobina.

Tionin djeluje katalitički na stvaranje hemoglobina.

Janusovo zelenilo u nižim koncentracijama do 2 ml 0,05% boje ne djeluje značajnije. U većim koncentracijama djeluje izrazito katalitički.

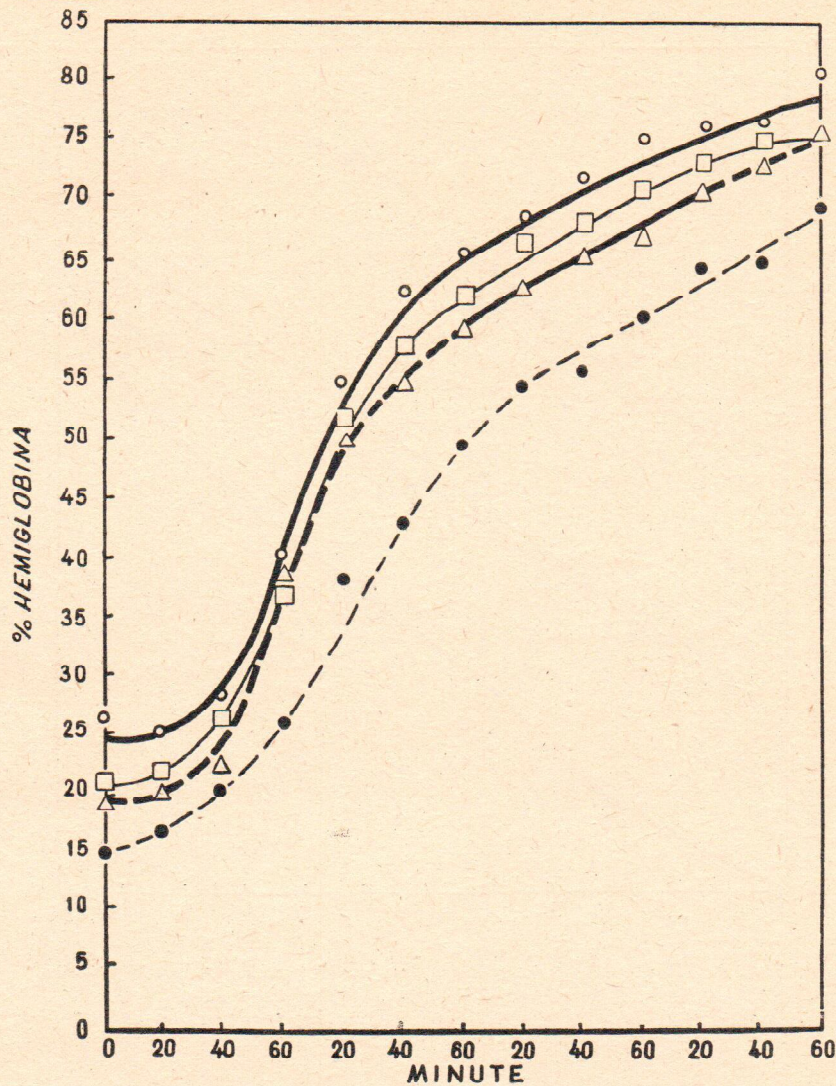
Briljantalizarinsko modrilo, osim u koncentraciji od 4 i 5 ml 0,05% otopine boje na 20 ml krvi, ne djeluje značajnije na stvaranje hemoglobina.

Indigosulfonatski natrij djeluje u ispitanj reakciji pozitivno. Njegovo djelovanje raste uporedo s povećanjem koncentracije.

Djelovanje toluidinskog modrila je u ispitanim uvjetima i koncentracijama katalitičko. Na slici 5 prikazane su neke od ispitanih koncentracija.

Koncentracije metilenskog modrila razlikovale su se od onih u ostalim pokusima s organskim bojama. Početne koncentracije niže su negoli

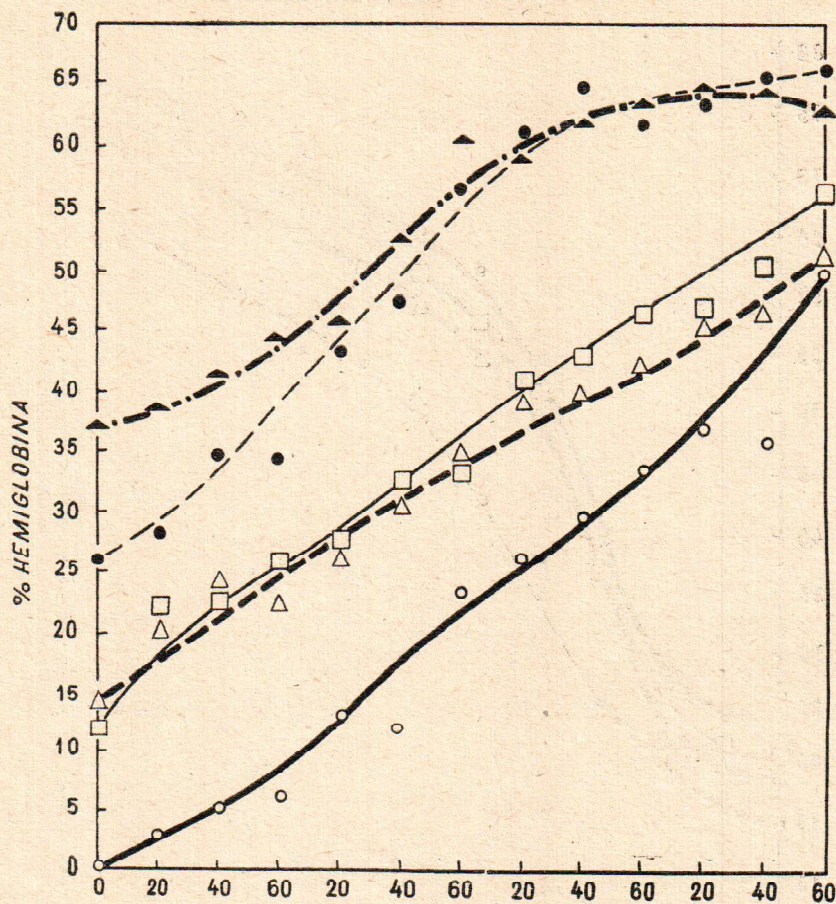




Sl. 4. Stvaranje hemiglobina u prisustvu boje bengalska roza. Na 20 ml krvi dodano 5.0 ml 0.9% NaCl (kontrolni uzorak) (o) odnosno 5.0 ml 0.9% NaCl koji sadrži 0.002% (Δ), 0.005% i 0.01% (●) bengalske roze.

u ostalim pokusima s organskim bojama: uzeto je 0,1 ml 0,05% otopine na 20 ml krvi, pa zatim 0,3 ml, 0,5, 1, 1,15, 2, 2,5, 4 i 5 ml. U svim ispitanim uslovima metilensko modrilo je kataliziralo stvaranje hemiglobina. Na slici 6 vidi se tok krivulja samo u nekim ispitivanim uslovima. U pokusima, u kojima je osim metilenskog modrila dodavana i askorbinska kiselina, zapaženo je brže nastajanje hemiglobina.





Sl. 5. Stvaranje hemoglobina u prisustvu toluidinskog modrila. Na 20 ml krvi dodano 5,0 ml 0,9% NaCl (kontrolni uzorak) (o), odnosno 5,0 ml 0,9% NaCl koji sadrži 0,025% ( $\Delta$ ), 0,030% ( $\square$ ) i 0,05% ( $\bullet$ ) toluidinskog modrila.

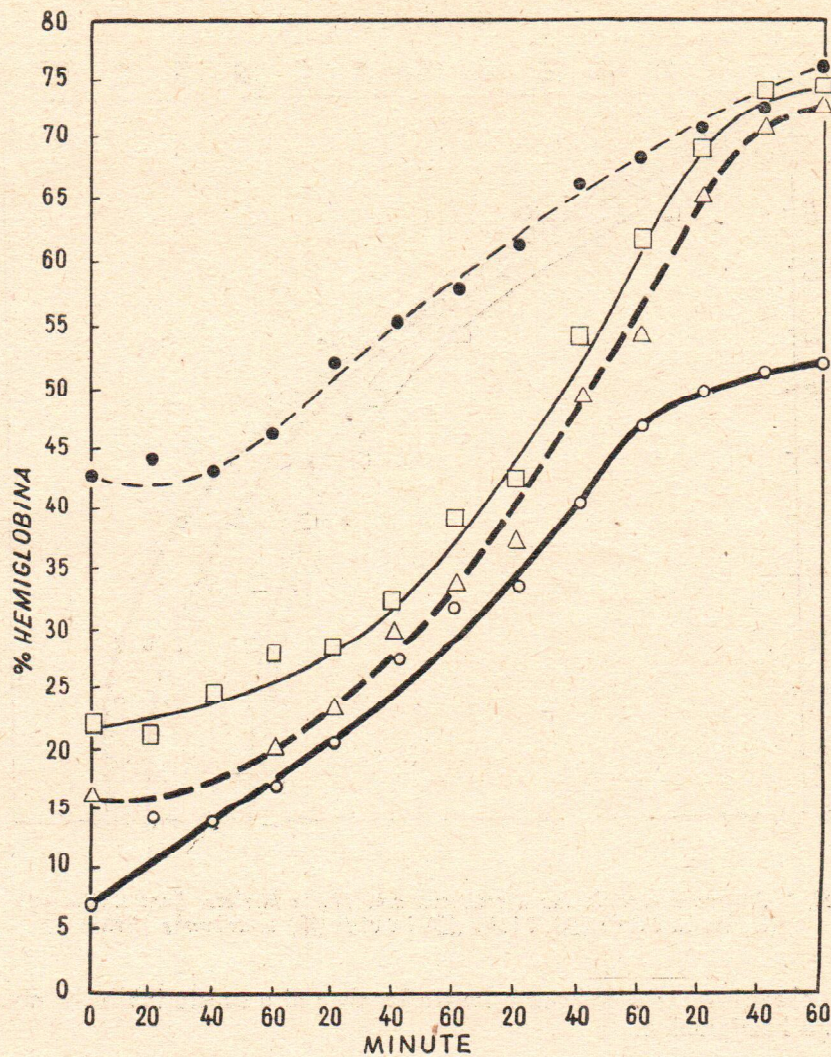
#### *Redukciona sredstva*

Askorbinska kiselina djelovala je u našim uslovima inhibitorno. Na slici 7. prikazane su krivulje s nekima od ispitanih koncentracija.

Tiozinamin u koncentracijama većim od 0,05% djeluje katalitički na stvaranje hemoglobina.

Glutation je dodan krvi samo u dvije koncentracije, i to 0,01% i 0,02%. U obje ove koncentracije on katalizira stvaranje hemoglobina (slika 8).



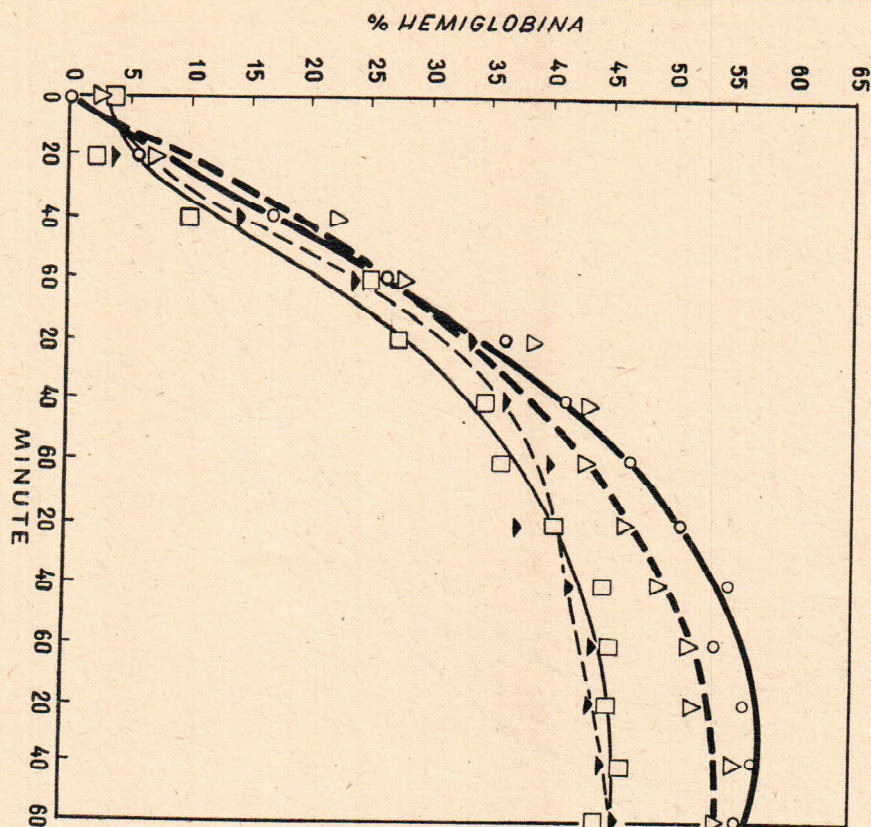


Sl. 6. Stvaranje hemoglobina u prisustvu metilenskog modrila. Na 20 ml krvi dodano 3.0 ml 0.9% NaCl (kontrolni uzorak) (o) odnosno 0.033% (Δ), 0.041% (□) i 0.050% (●) metilenskog modrila.

Djelovanje cistina ispitano je u koncentraciji od 0,02%, 0,05%, 0,07%, 0,1% i 0,14%. Svi uzorci koji su sadržavali cistin, imali su veći postotak hemoglobina negoli kontrolna serija.

Kod analiza sa cisteinom može se zaključiti da njegovo djelovanje u ispitanim koncentracijama (0,02%, 0,05%, 0,07%, 0,1%, 0,2% i 0,55%)





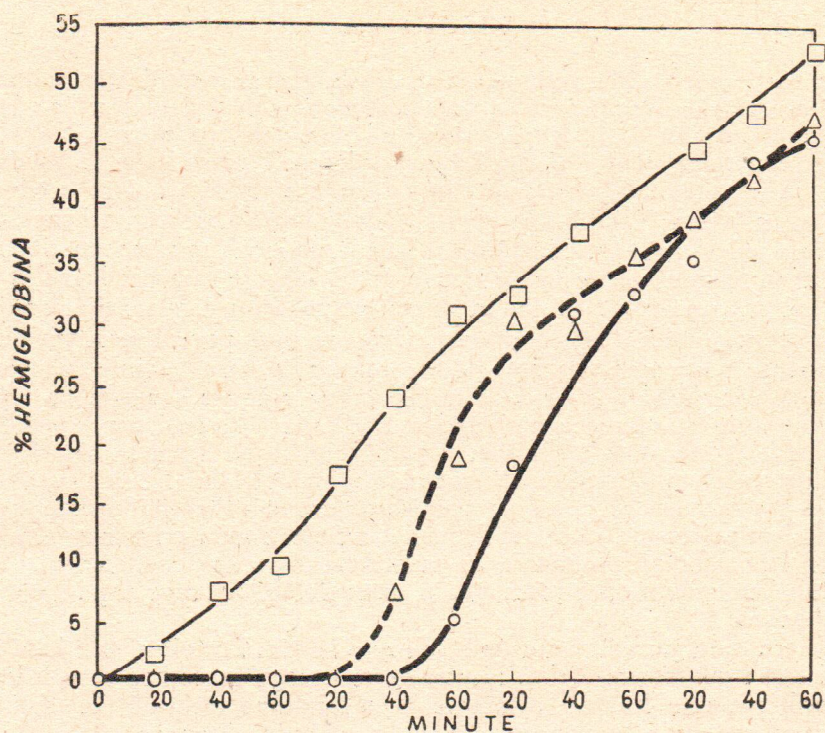
Sl. 7. Stvaranje hemiglobina u prisustvu askorbinske kiseline. Kontrolni uzorak (o), krv sa 0.02% ( $\Delta$ ), 0.05% ( $\square$ ) i 0.07% ( $\bullet$ ) askorbinske kiseline.

ne pokazuje izraziti efekt ni u smislu katalize ni u smislu inhibicije stvaranja hemiglobina.

#### Kinetika reakcije

Promatranjem reakcije stvaranja hemiglobina kod sušenja krvi u prisustvu stranih tvari s aspekta kemijske kinetike i računanjem konstante brzine reakcije prema zakonima za reakcije prvog reda, utvrdili smo da je i ovaj proces, kao i stvaranje hemiglobina sušenjem krvi bez dodatka katalizatora ili inhibitora (2), reakcija prvog reda. To je dokaz da dodane tvari zaista ne ulaze u reakciju kao reaktanti. U tablici 1 izabrali smo jednu od serija eksperimenata za koju su izneseni rezultati za konstantu brzine reakcije u toku cijelog pokusa.





Sl. 8. Stvaranje hemiglobina u prisustvu glutationa. Kontrolni uzorak (o), krv sa 0.01% ( $\Delta$ ) i 0.02% ( $\square$ ) glutationa.

Tablica 1  
Stvaranje hemiglobina u krvi u prisustvu fenola (4%)

t	t'	x	x'	100 - x'	$\log \frac{100}{100 - x'}$	0,4343 k
0		41				
20		41,5				
40		43				
60		46,5				
80	0	45,3	0	100	0,00000	—
100	20	50,9	5,6	94,4	0,02503	(0,00125)
120	40	52,2	6,9	93,1	0,03105	0,00077
140	60	54,5	9,2	90,8	0,04191	0,00070
160	80	57,7	12,4	87,6	0,05750	0,00072
180	100	60,7	15,4	84,6	0,07263	0,00072
200	120	64	18,7	81,3	0,08991	0,00075
220	140	67	21,7	78,3	0,10624	0,00076
240	160	69,8	24,5	75,5	0,12205	0,00076

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k} = 400 \text{ minuta}$$

$$\bar{x} = 0,00074$$

$$k = 0,00173$$



## DISKUSIJA

Iz eksperimentalnih podataka vidi se da mnoge supstancije dodane krvi pri sušenju djeluju na stvaranje hemiglobina drugačije nego *in vivo*.

Fenoli i amini su izrazita sredstva za redukciju, pa bismo očekivali da će generalno inhibirati istraživanu reakciju. Ustanovljeno je, međutim, da se takve inhibicije pojavljuju razmjerno rijetko i samo u određenim uslovima. Tako hidrokinon snažno katalizira stvaranje hemiglobina pri sušenju krvi sve do 100% u razmjerno kratkom vremenu. Slično utječu pirogalol i metol na brzinu reakcije, iako je sam tok krivulja u sve tri reakcije drugačiji. Anilin i fenol ne pokazuju izrazito djelovanje ni u jednom ni u drugom pravcu. Ovo, na prvi pogled neočekivano, ponašanje polifenola povezuje se s peroksidnim karakterom oksihemoglobina. Molekularni kisik, koji se kao takav veže na hemoglobin, nije aktivan u smislu oksidacijske reakcije. Kad sada neko sredstvo za redukciju veže jedan atom tog kisika u peroksidu, drugi atom se aktivira i postaje sposoban da oksidira hemoglobin u hemiglobin. U pojedinostima taj je proces vrlo složen, a uglavnom karakteriziran time što kisik, posredovanjem polifenola, oduzima hemoglobinu elektrone i pri tom se stvara kinon i hemiglobin. Međutim, u većini koncentracija fenoli mogu tako nastali hemiglobin opet reducirati u hemoglobin, pa zbog toga djeluje inhibitorno.

Utjecaj anorganskih neutralnih soli nije izrazit. Postoje slabiji katalitički kao i inhibitorni efekti. Neutralne soli mogu inače kod drugih kemijskih reakcija izazvati primarne ili sekundarne elektrolitske efekte, a time pospješuju ili usporuju brzinu tih reakcija. U ovoj reakciji se to ne događa. Može se smatrati da je ta reakcija tako složena, da jednostavniji utjecaji ne dolaze do znatnijeg izražaja.

Utjecaj organskih boja na ovu reakciju je od naročito interesa, jer se neke organske boje upotrebljavaju za liječenje prirodne ili stečene hemoglobinemije. Djelovanje ovisi i o dodanoj količini (6, 7, 8). Ispitano je djelovanje tionina, nilskog modrila, krezilnog modrila, kapriovog modrila, metilenskog modrila i toluidinskog modrila; pri tom se je utvrdilo da je djelovanje skoro podjednako (9). Djelovanje organskih boja tumači se i peroksidnim karakterom oksihemoglobina. Uloga organskih boja u reakciji hemoglobin-hemiglobin je uloga katalizatora. Organske boje predstavljaju oksidirani oblik određenog redoksnog sustava. Ove redoksne boje poznate su kao katalizatori drugih redoksnih reakcija. Zbiva li se koja redoksna reakcija sporo, mada su termodinamički uslovi povoljni, kaže se da postoje kinetičke smetnje, a takve smetnje mogu odstraniti redoksni katalizatori, npr. redoksne boje sa srednjim normalnim redoksnim potencijalom. Zbog toga se i metilensko modrilo u zajednici s askorbinskom kiselinom upotrebljava u terapijske svrhe za liječenje hemoglobinemije. Metilensko modrilo pospješuje reduktivno djelovanje askorbinske kiseline na hemiglobin, brzo se stvara hemoglobin, koji dalje utjecajem kisika prelazi u oksihemoglobin. Pri izvođenju pokusa sušenja krvi u prisutnosti organskih redoksnih boja, bilo je zna-



čajno da te boje oboje krv. Postojala je zbog toga mogućnost da se dobiju krivi podaci kod optičkih određivanja hemiglobina diferencijalnom spektralnom fotometrijom. U toku rada je, međutim, ustanovljeno da su rezultati bili uvijek jednoznačni, bez obzira na to koja je redoksna boja bila upotrijebljena. Iz ove se činjenice može zaključiti da obojenost krvi u prisustvu organskih boja nije smetala kod optičkih određivanja hemiglobina. Organske redoksne boje pretežno djeluju pozitivno katalitički na stvaranje hemiglobina kod sušenja krvi. Metilensko modriilo to čini čak i u prisustvu askorbinske kiseline. Postoji, dakle, bitna razlika u djelovanju tih boja *in vitro* s jedne strane i *in vivo* s druge strane. Ta činjenica se može tumačiti i tako da su *in vivo* prisutni redukcionni sistemi koji mijenjaju smjer zbivanja u smislu stvaranja redukcionnih oblika hemoglobina, a u odsutnosti tih sistema – *in vitro*, nakon djelomičnog osušenja krvi – redoksni katalizatori pospješuju reakcije koje idu u drugom smjeru, u smjeru stvaranja hemiglobina.

Kao posljednja grupa upotrijebljena su sredstva za redukciju, i to askorbinska kiselina i organski spojevi sumpora. Askorbinska kiselina, kao jako reduktivno sredstvo, snažno inhibira stvaranje hemiglobina pri sušenju krvi. Čini se da je to obična redukcija. Međutim, prilično neočekivano bilo je da tiozinamin, glutation i cistin kataliziraju tu reakciju. Svakako se vidi da je utjecaj tih tvari zamršene naravi, pa će za potpuno razjašnjenje njihova djelovanja biti potrebno izvršiti veći broj pokusa.

Kinetika ovih procesa nije bila poznata. Mi smo istraživali u prijašnjem radu (2) kinetičku obradu osnovne reakcije stvaranja hemiglobina pri sušenju krvi. U ovim smo ispitivanjima istražili tok kinetičke reakcije u prisutnosti raznih supstancija koje su dodane u malim količinama. Reakcija teče i ovdje prema zakonima kemijske kinetike za reakcije I reda, tj. dodane tvari samo kataliziraju ili inhibiraju osnovni proces ne ulazeći u samu reakciju kao reakcione komponente.

### ZAKLJUČAK

Ispitan je utjecaj većeg broja fenola i amina, anorganskih soli, organskih boja i nekih reducirajućih supstancija na stvaranje hemiglobina kod sušenja krvi. Neke od ispitanih tvari nemaju većeg efekta na reakciju, dok druge djeluju kao jači ili slabiji aktivatori ili inhibitori. Utjecaj tih supstancija ispitan je i sa stajališta kemijske kinetike, pa je utvrđeno da se proces stvaranja hemiglobina pod tim uslovima zbiva prema zakonima kinetike za reakcije I reda.

### Literatura

1. Mikac-Dević, D., Weber, K.: Glasnik hemijskog društva, Bgd, 26, (1961) 197.
2. Mikac-Dević, D.: Arh. hig. rada i toksikol. 14, (1963), 179.
3. West, S., Todd, W.: Textbook of biochemistry, Macmillan Co, N. Y. 1955.
4. Eggleton, P., Fegler, G.: Quat. J. of Expt. Physiol. 37, (1952), 163.



5. Warburg, O., Christian, W.: *Biochem. Z.* 242, (1931), 206.
6. Finch, A.: *New Engl. J. Med.* 239, (1948), 470.
7. Warburg, O., Reid, A.: *Biochem. Z.* 242, (1931), 149.
8. Kiese, M.: *Biochem. Z.* 316, (1944), 262.
9. Kiese, M., Waller, H.: *Arch. Exp. Path. Pharm.* 213, (1951), 44.

#### Zusammenfassung

### DIE BILDUNG DES HÄMIGLOBINS BEIM TROCKNEN DES BLUTES. III DIE WIRKUNG VERSCHIEDENER FAKTOREN AUF DIE BILDUNGSGESCHWINDIGKEIT DES HÄMIGLOBINS

Es wurde der Einfluss verschiedener chemischer Stoffe auf die Reaktion der Hämoglobinbildung während des Trocknens des Blutes untersucht. Es wurden verschiedene Gruppen der Zusatzstoffe verwendet, wie Phenole und aromatische Amine (Phenol, Hydrochinon, Resorcin, Metol, Pyrogallol und Anilin), organische Farbstoffe (Rhodamin B, Eosin, Rose Bengale, Thionin, Janusgrün, Brillantalarinblau, Indigosulfonat, Toluidinblau und Methylenblau) und ausgesprochen reduzierend wirkende Stoffe (Ascorbinsäure, Thiosinamin, Glutathion und Cystin). Der Zweck dieser Versuche war festzustellen, ob die Wirkung der genannten Stoffe bei Trocknen des Blutes sich wesentlich von ihrer Wirkung *in vivo* im Blutkreislauf unterscheidet, da ja bekannt ist, dass manche Fremdstoffe ohne nennenswerte Wirkung im Blutkreislauf, wieder ausgeschieden werden.

Für Phenole und aromatische Amine wäre zu erwarten, dass sie allgemein die Hämoglobinbildung beim Blutrocknen inhibieren würden. Die Versuche zeigten jedoch, dass dies nicht immer der Fall ist. Hydrochinon katalysiert z. B. kräftig die Hämoglobinbildung während dem Blutrocknen. Solches Verhalten der Polyphenole wird mit dem Peroxydcharakter des Oxyhämoglobins in Zusammenhang gebracht.

Der Einfluss der anorganischen Neutralsalze auf die Hämoglobinbildung während dem Blutrocknen ist nicht wesentlich.

Die organischen Redox-Farbstoffe wirken vorwiegend positiv katalytisch auf die Hämoglobinbildung während dem Blutrocknen. Methylenblau wirkt in diesem Sinne selbst bei Anwesenheit von Ascorbinsäure. Es besteht demzufolge ein wesentlicher Unterschied in der Wirkung dieses Farbstoffes *in vivo* im Blutkreislauf und *in vitro* beim Blutrocknen. Dies steht offenbar im Zusammenhang mit der Wirkung der Reduktascensysteme des Blutes, die sich beim Blutrocknen inaktivieren.

Ascorbinsäure als starkes Reduktionsmittel inhibiert hervorragend die Hämoglobinbildung während des Blutrocknens. Thiosinamin, Glutathion und Cystin wirken positiv katalytisch.

Bei der Prüfung der Kinetik dieser Reaktionen wurde festgestellt, dass die Zusatzstoffe die Reaktionsordnung nicht ändern. Auch bei Anwesenheit so verschiedener Stoffe bleibt die Reaktion I. Ordnung.

Krankenhaus Dr. M. Stojanović,  
Medizinische Fakultät der Universität  
Zagreb

Eingegangen am 18. VII 1964