

STVARANJE HEMIGLOBINA SUŠENJEM KRVI

II Kinetika ove reakcije

DUŠANKA MIKAC-DEVIĆ

Medicinski fakultet, Bolnica Dr. M. Stojanović, Zagreb

(Primljeno 9. X 1963)

U nizu pokusa pod raznim uvjetima, ispitana je reakcija stvaranja hemiglobina u krvnim mrljama. Određivanja hemiglobina vršena su modificiranom Heilmeyerovom metodom na principu diferencijalne spektralne fotometrije. Utvrđeno je da je brzina reakcije najveća u vremenu sušenja od prvog do četvrtog sata, a da ni nakon osam dana ne dostiže vrijednost od 100%. Kako količina stvorenog hemiglobina ovisi o vremenu sušenja, reakcija je praćena i s aspekta kemijske kinetike, pa je konstatirano da se podvrgava zakonima kinetike za reakcije I reda. Komparirano je ponašanje stvaranja hemiglobina i u uzorcima koji su uz hemoglobin imali i postotak fetalnog hemoglobina te karboksihemoglobina. Učinjena je usporedba sa stvaranjem hemiglobina pod tim uvjetima i u krvi nekih sisavaca i ptica.

Poznato je da se u krvi koja cirkulira osim reduciranog hemoglobina i oksihemoglobina nalaze i male količine methemoglobina. U methemoglobinu željezo se nalazi u trovaljanom obliku, stoga se po *Paulingu* (1) zove hemiglobin, a promjena je karakteristična u prvom redu u hem dijelu molekule, iako neki radovi ukazuju da istovremeno i u globinskom dijelu molekule dolazi do oksidacije nekih grupa (2, 3).

In vivo se u normalnim uvjetima stalno stvara hemiglobin, ali sistem reduktaza eritrocita prevodi stvoreni hemiglobin ponovo u hemoglobin i održava ravnotežu reakcije hemoglobin-hemiglobin na nivou vrlo niskih koncentracija hemiglobina. Fiziološka gornja granica hemoglobina u krvi koja cirkulira je prema *Heubneru* (4) 2,4%, *Paulu* (5) 0,5%, a prema *Slykeu* (6) 1%. U slučaju poremetnje encimatskog reduktivnog sistema odgovornog za gornju ravnotežu, nagomilavaju se veće količine hemoglobina u krvi. Encimatski sistem zataji ili zbog hereditarnog defekta ili zbog djelovanja određenih kemijskih agensa. Kako hemiglobin ne može labilno vezati kisik poput hemoglobina, to njegova veća koncen-

tracija, nastala iz oba izložena razloga, stvara patološko stanje organizma, takozvanu hemiglobinemiju.

Osim stvaranja hemiglobina *in vivo*, postoje i procesi prelaza hemoglobina ili oksihemoglobina u hemiglobin *in vitro*. Poznato je da kod krvnih mrlja koje se suše na zraku dolazi do stvaranja većih količina hemoglobina. Značajno je i to da je ta oksidacija u kvantitativnom pogledu ovisna o vremenu sušenja pa se daje pratiti s aspekta kemijske kinetike. Kako je ovaj problem interesantan u nekim sudsko-medicinskim slučajevima istraživanja krvnih mrlja, to je cilj ovog rada proučiti ovu reakciju u raznim uvjetima i ispitati kinetički tok reakcije.

METODA I REZULTATI RADA

Za sušenje krvi upotrijebljen je ovaj način rada: određena količina krvi nanosena je u jednakomjerno razdjelnim kapljicama u staklene posudice, Petrijeve zdjele, sušena na zraku i u određnim vremenskim razmacima ustanovljen je sadržaj na hemiglobinu. Za određivanje hemoglobina služili smo se metodom diferencijalne spektralne fotometrije, (7) koja je metoda prilagođena određivanju u krvnim mrljama (8). Ova nam se tehnika pokazala vrlo prikladna upravo zbog kinetičkog ispitivanja toka krivulje.

Za svaki vremenski period, iz tehničkih razloga, analiza je vršena iz uzorka koji je sušen zasebno. Može se smatrati da su odstupanja pojedinih vrijednosti unutar jednog pokusa od srednje vrijednosti krivulje za brzinu reakcije u vezi s tim načinom pripreme uzoraka.

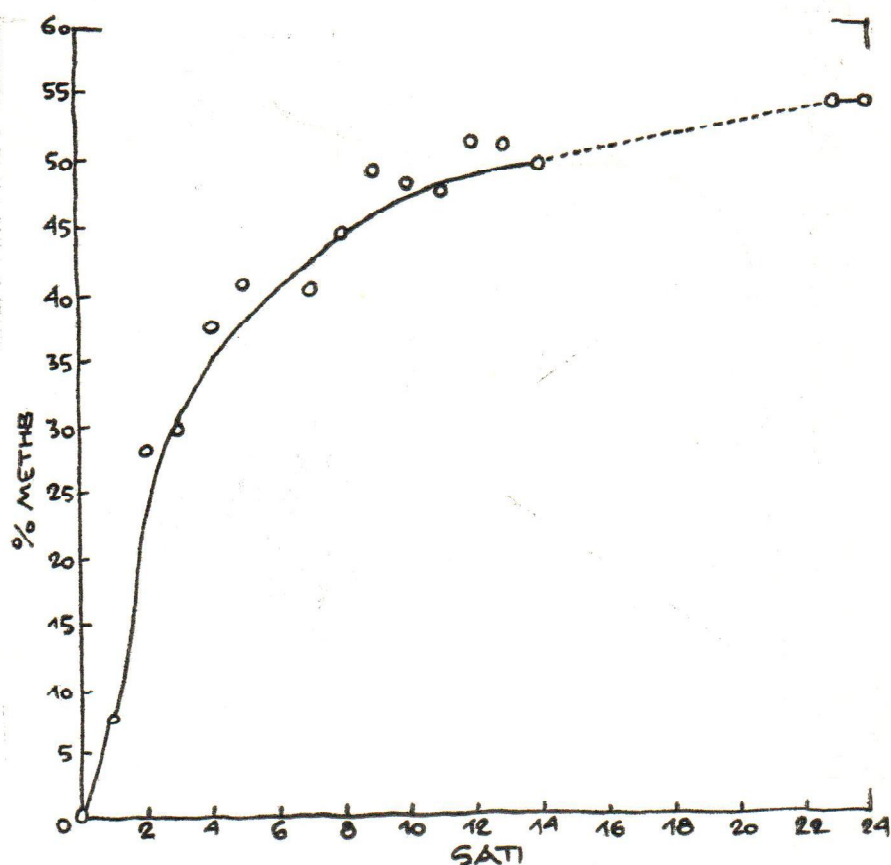
Kao materijal služila je krv koja se daje kod transfuzije, ali koja iz bilo kojeg razloga nije bila pogodna za pacijenta. Krv je sadržavala smjesu natrijeva citrata i dekstroze. Komparativne analize te krvi sa svježe izvađenom krvi uz antikoagulans kalijev oksalat, i sa krvi naprasno umrle osobe, pokazale su da ova sredstva, dodana u svrhu antikoagulacije i konzerviranja, ne utječu na reakciju stvaranja hemoglobina.

Kao prvo, promatralo se nastajanje hemoglobina u sušenoj krvi u periodu od 24 sata. Svaki sat je vršena analiza. Rezultati su prikazani na dijagramu 1. Iz toka krivulje u periodu prvog sata vidi se da je količina stvorenog hemoglobina mala, između prvog i drugog sata krivulja naglo raste i dostiže vrijednosti od 40% hemoglobina. Daljnim sušenjem sve do 24 sata povećava se koncentracija hemoglobina za svega još oko 20%.

Sušenjem krvi nekoliko dana nije se postigao potpuni prijelaz hemoglobina u hemiglobin, jer je nakon 8 dana bilo samo 80% hemoglobina (dijagram 2).

Najinteresantniji je tok krivulje u periodu od prvih nekoliko sati, pa smo dalja ispitivanja vršili u periodu sušenja od 4 sata, analizirajući uzorke u razmacima od 20 minuta (dijagram 3).

DIAGRAM 1.



Kad smo sušenje proveli s opranim eritrocitima, koje smo radi iste koncentracije razrijedili s fiziološkom otopinom soli na prvotni volumen, krivulja stvaranja hemiglobina (dijagram 4) pokazuje da je zbog nedostatka, u prvom redu, askorbinske kiseline i glutationa u prvim fazama sušenja stvaranje hemiglobina ubrzano, jer nije bilo faktora koji bi djelovali u ovoj fazi na redukciju stvorenog hemiglobina.

U krvi koja sadržava znatnu količinu karboksihemoglobina, u našem slučaju imali smo 74% karboksihemoglobina, oksidirao se samo hemoglobin u hemiglobin. Karboksihemoglobin je toliko stabilan da ostaje i u tim uvjetima neizmijenjen (dijagram 5).

Fetalni hemoglobin nije pri sušenju utjecao na brzinu stvaranja hemiglobina. Ispitana je krv djeteta sa 3,3% fetalnog hemoglobina određ-

DIAGRAM 2.

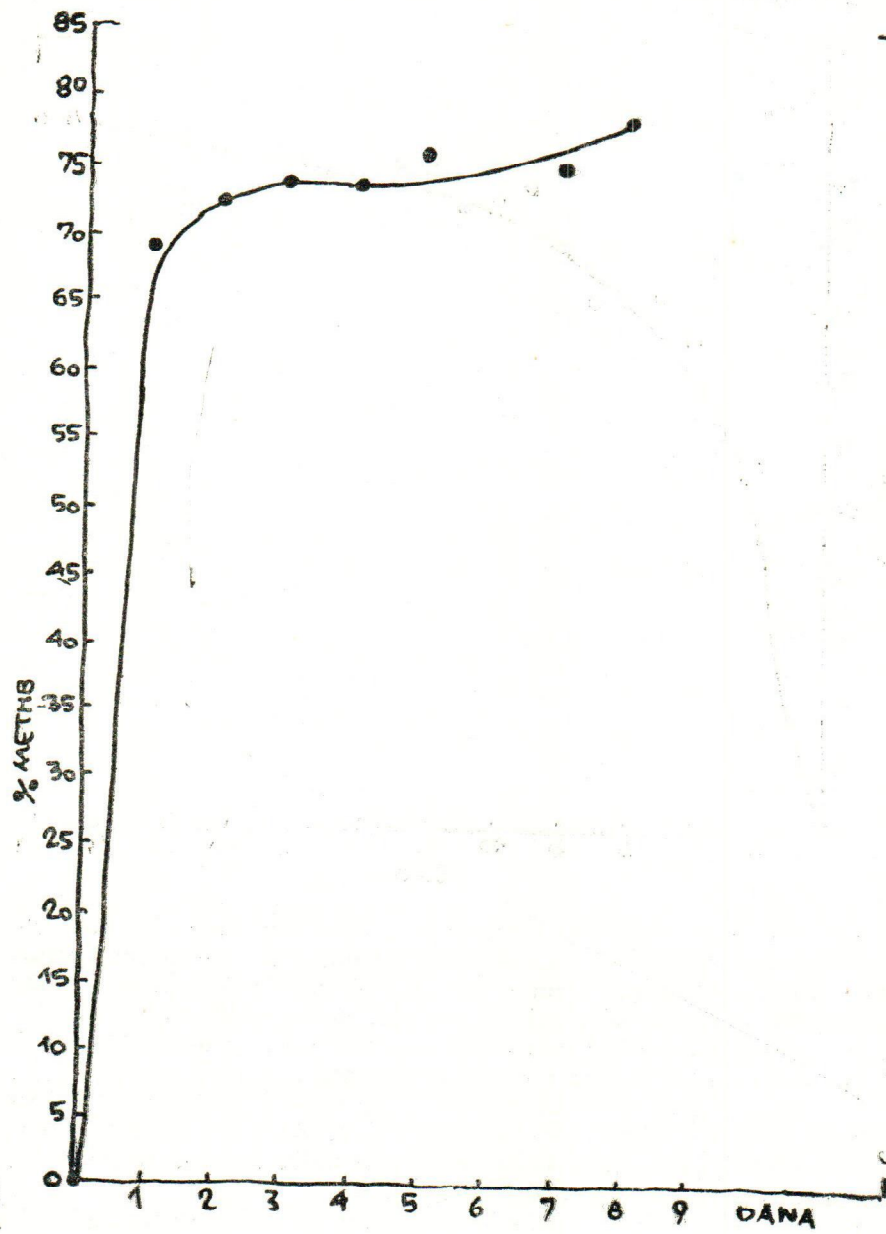
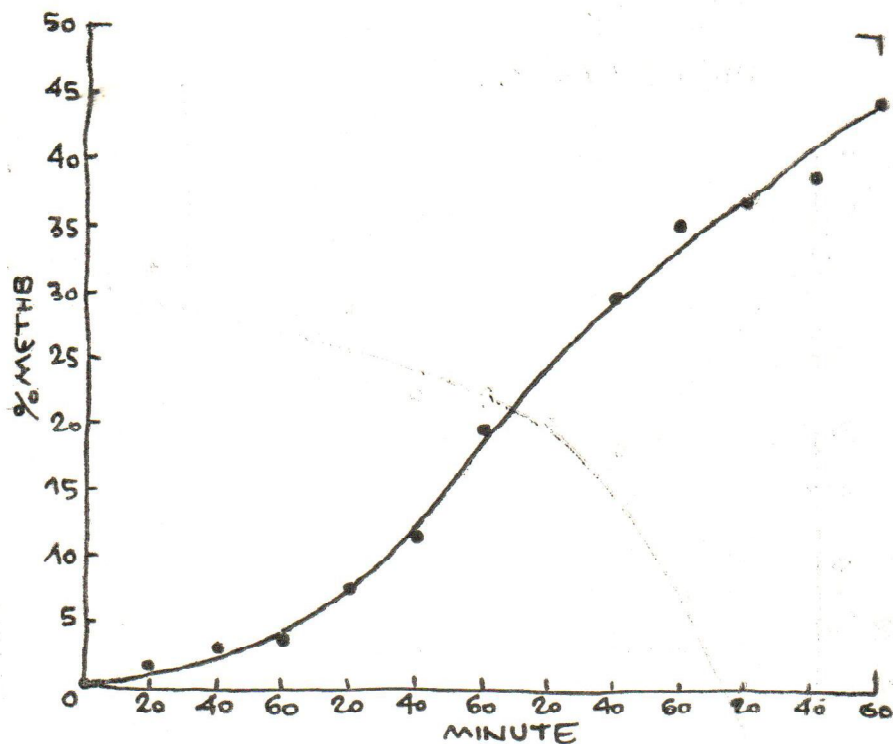


DIAGRAM 3.



nog po metodi Singera (9). Uzorci placentarne krvi s postotkom fetalnog hemoglobina od 50–60% u komparaciji s krvi koja sadržava samo hemoglobin, tj. krvi normalnog odraslog čovjeka, potvrdili su navedeni eksperiment. To je značajno, jer fetalni hemoglobin in vivo ima veći afinitet prema kisiku u smislu peroksidnog vezivanja kisika, a isto tako u smislu lakše oksidacije u hemiglobin (dijagram 6). Kod djece dolazi lakše do hemiglobinemije uzrokovane nitratima iz tekuće vode zbog toga što nitrati, odnosno nitriti koji nastaju iz nitrata, lakše stvaraju hemiglobin s fetalnim hemoglobinom negoli s hemoglobinom odraslih (10).

Brzina reakcije stvaranja hemiglobina kod nekih životinjskih vrsta komparirana je s istom reakcijom u krvi čovjeka. Kod sisavaca je uzeta u razmatranje krv konja, krave, teleta, ovce i psa. Uza svaki uzorak krvi životinje paralelno je rađena kontrolna serija. Samo kod krvi psa uočene su razlike. Hemiglobin se stvarao sporije negoli kod čovjeka (dijagram 7).

DIAGRAM 4.

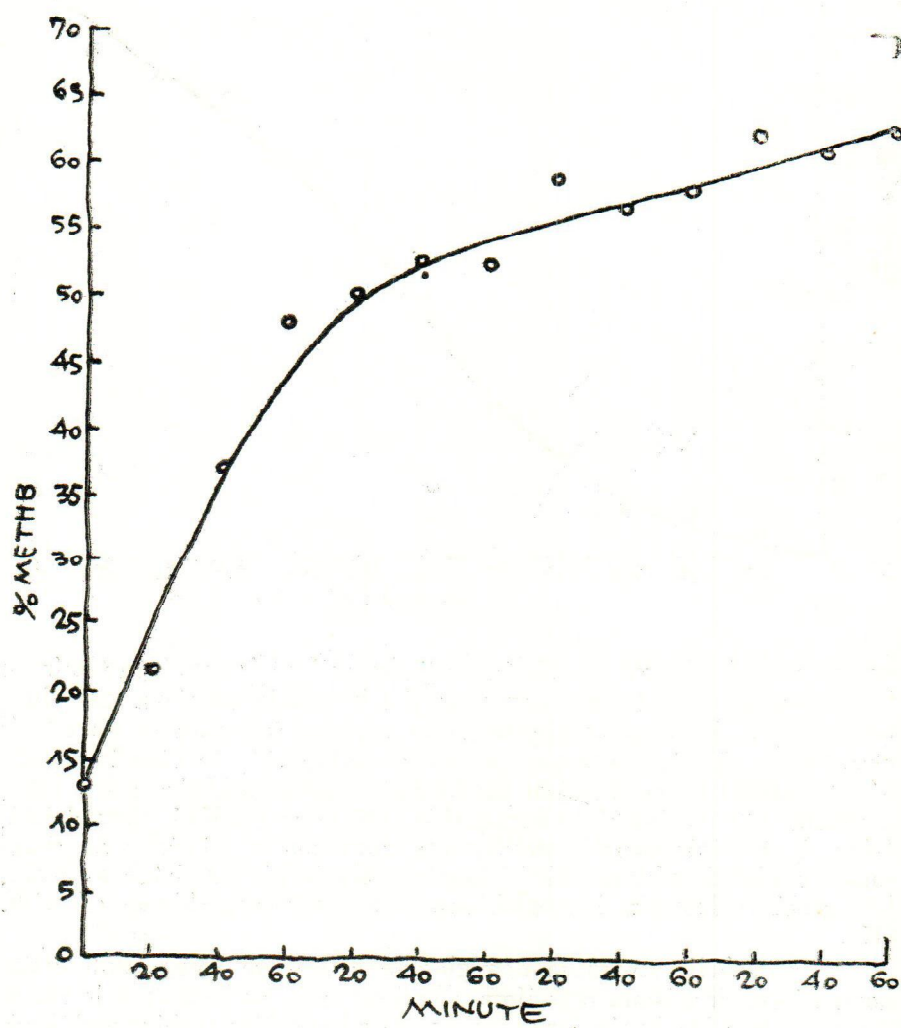
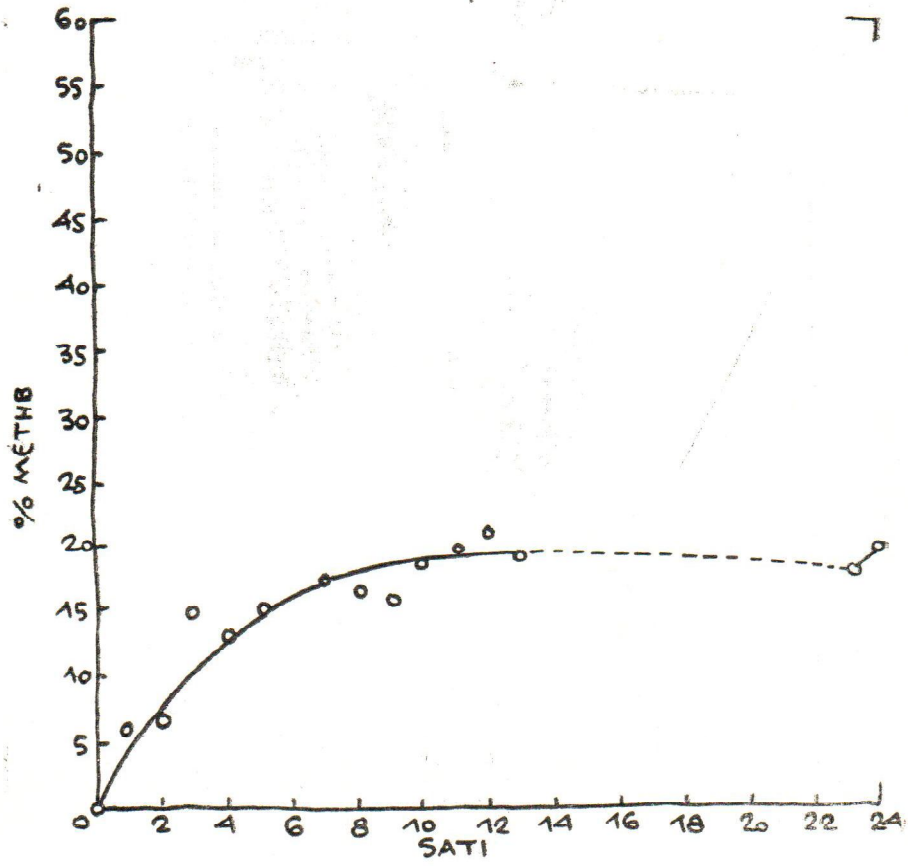
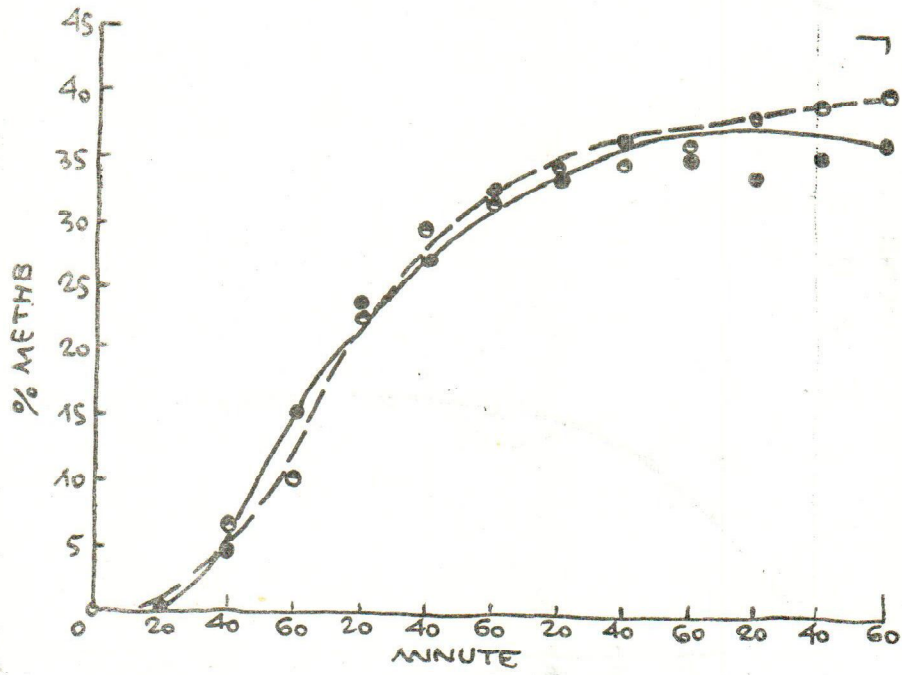


DIAGRAM 5.



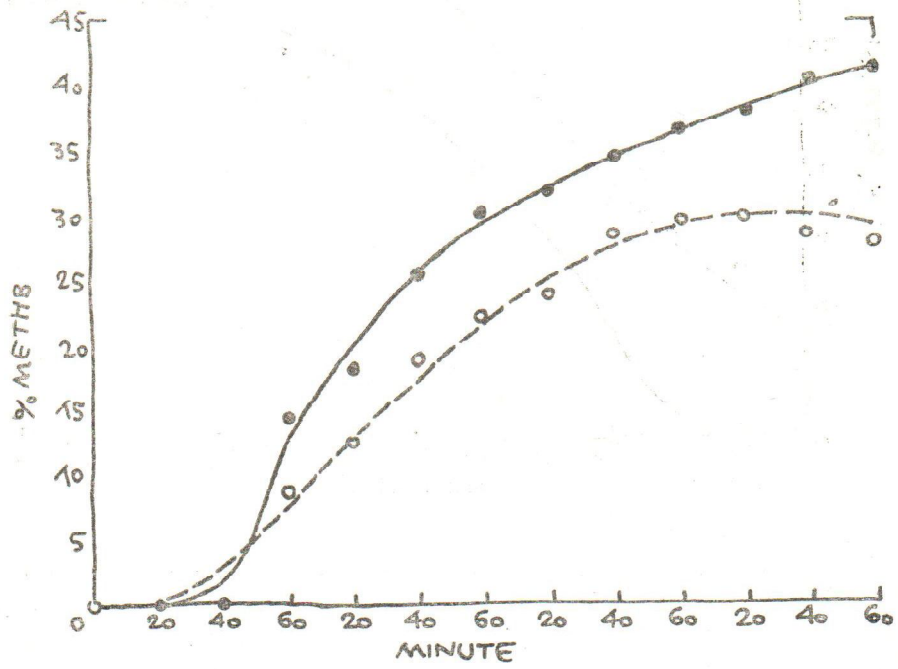
— ○ KONTROLNA KRV
- - ○ KRV IZ PLACENTE

DIAGRAM 6.



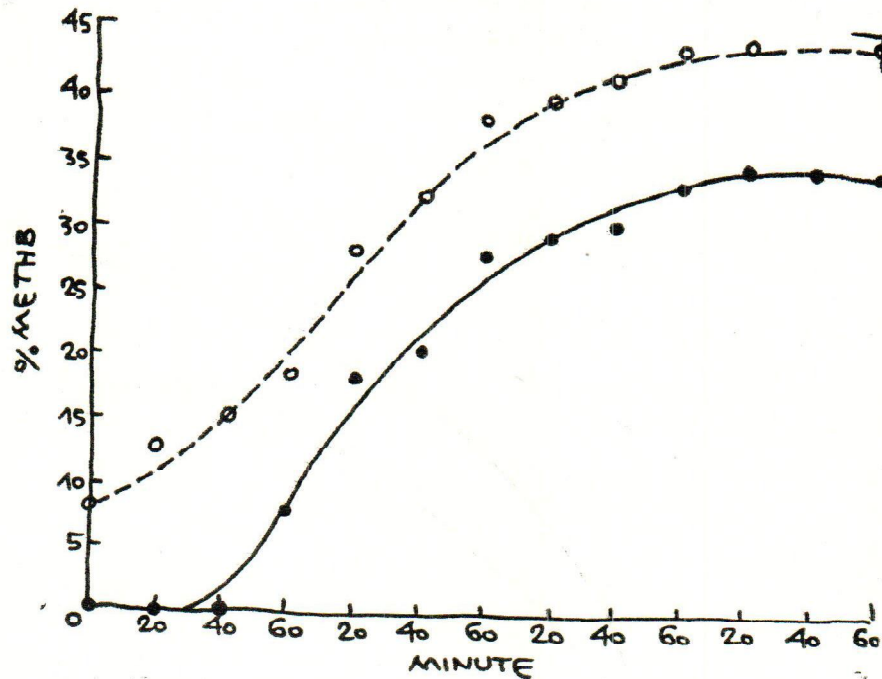
— ● KONTROLNA KRV
- - ○ KRV PSA'

DIAGRAM 7.



— ● KONTROLNA KRV
 - - - ○ KRV PURANA
 DOBIVENA PUNKCIJOM SRCA

DIAGRAM 8.



Osim sisavaca, od životinjskih vrsta uzete su u razmatranje ptice. Ova vrsta bila je u tim pokusima zanimljiva, jer ptice imaju eritrocite s jezgrom, pa se postavilo pitanje pokazuje li takva krv ikakve razlike u brzini reakcije stvaranja hemiglobina kod sušenja krvi, s obzirom na ponašanje krvi pod tim uvjetima kod čovjeka. Pokusi su rađeni s krvi pilića i purana (dijagram 8). U svim eksperimentima te vrste zapaženo je brže nastajanje hemiglobina negoli kod čovjeka. Razlog tome bit će upravo u drugačijoj gradnji eritrocita, a to uvjetuje bržu oksidaciju. Razlog može biti i u tom da globinska komponenta tih krvi daje manju stabilnost hemoglobina s obzirom na oksidativni prijelaz u hemiglobin.

Kinetička obrada reakcije

Kod prijelaza hemoglobina u hemiglobin reaktanti koji sudjeluju su hemoglobin i kisik iz zraka. Koncentracija druge komponente, kisika iz zraka, nalazi se u reakcionoj smjesi u velikom suvišku, pa promjena njezine koncentracije ne utječe na brzinu reakcije, tj. samo koncentracija hemoglobina uvjetuje red reakcije.

Tablica 1

Izračunavanje konstante brzine reakcije u kontrolnoj seriji u pokusima sa krvi krave. Analize rađene 4 sata svakih 20 minuta

| t | t' | x | x' | 100 - x' | $\log \frac{100}{100 - x'}$ | 0,4343 k |
|---------------------------|------|-----|------|----------|-----------------------------|----------|
| 0 | | | | 0 | | |
| 20 | | | | 1.6 | | |
| 40 | 0 | 0 | 100 | 3.7 | 0,00000 | — |
| 60 | 4,6 | 20 | 95,4 | 8,3 | 0,02045 | 0 00102 |
| 80 | 12,6 | 40 | 87,4 | 16,3 | 0,05849 | 0 00145 |
| 100 | 22,5 | 60 | 77,5 | 26,2 | 0,11070 | 0 00184 |
| 120 | 24,4 | 80 | 75,6 | 28,1 | 0,12148 | 0 00151 |
| 140 | 25,5 | 100 | 74,5 | 39,2 | 0,12784 | 0 00127 |
| 160 | 26,5 | 120 | | 40,2 | 0,13371 | 0 00111 |
| 180 | 28,8 | 140 | 71,2 | 42,5 | 0,14752 | 0 00105 |
| 200 | 30 | 160 | 70 | 43,7 | 0,15490 | 0 00096 |
| 220 | 40,6 | 180 | 59,4 | 44,3 | 0,22621 | 0 00126 |
| 240 | 41,3 | 200 | 58,7 | 45 | 0,23136 | 0 00115 |
| Srednja vrijednost 0.4343 | | | | | | 0.00126 |
| k = | | | | | | 0,00298 |

Stoga smo pokušali računati konstantu brzine reakcije kao za reakcije I reda, označivši sa 100 koncentraciju hemoglobina na početku reakcije, tj. u vremenu t_0 . Nakon vremena t smanjila se koncentracija hemoglobina na $100-x$, ako sa x imenujemo količinu stvorenog hemoglobina. Na tablici 1 dajemo podatke za konstantu brzine reakcije za jednu od reakcionih krivulja računane prema jednadžbi:

$$k = \frac{1}{0,4343 t} \log \frac{100}{100 - x}$$

Kako smo kod svih izračunavanja konstante brzine reakcije za cijelu seriju pokusa dobili iste vrijednosti s malim odstupanjima, potvrđena je pretpostavka da se kinetika te reakcije podvrgava zakonu za reakcije I reda.

Vrijeme potrebno za stvaranje 50% hemoglobina računano za reakcije I reda kreće se za našu ispitanu reakciju od 150 do 232 minute.

DISKUSIJA

U eksperimentalnom dijelu dao je prikazani rad rezultate koji omogućuju stvarati određene zaključke s obzirom na tok stvaranja hemiglobina u krvi in vitro za vrijeme sušenja. Sam tok eksperimentalne krivulje sastoji se iz tri faze. U prvoj fazi, koju smo nazvali indukciona faza, postotak stvorenog hemiglobina je vrlo nizak kroz duži period vremena. Ovo tumačimo time što su u toj fazi sistemi reduktaza koji in vivo održavaju ravnotežu hemoglobin – hemiglobin još uvijek aktivni i uspijevaju stvoreni hemiglobin reducirati, te njegova koncentracija ostaje u niskim vrijednostima. Ova indukciona faza s kinetičkog stajališta nije zanimljiva, pa u nekim serijama izračunavanja konstante brzine reakcije nije ovaj dio krivulje uzet u obzir. U tom slučaju se ordinata pomakla, i sa x' označen je postotak hemiglobina, a sa t' vrijeme u času kad se počelo računati.

U drugoj fazi, koja zauzima najveći dio krivulje u pokusima ispitivanja u periodu od 4 sata, prevladava komponenta oksidacije kisikom iz zraka, krivulja je strma, postotak hemiglobina u malim vremenskim razmacima brzo raste. Ovo tumačimo time da je encimatski sistem koji djeluje in vivo u toku sušenja postao sve više inaktivan pa nije u mogućnosti stvoreni hemiglobin u dovoljnoj mjeri reducirati. Promatrajući konstantu brzine reakcije u sve tri faze, mogli bismo reći da ova druga faza najbolje zadovoljava zahtjeve jednostavne kinetike.

Treća faza je kad se ponovo usporava brzina nastajanja hemiglobina. Značajno je istaknuti da se ni nakon sušenja od nekoliko dana nije stvorilo 100% hemiglobina. Može se pretpostaviti da se redukcioni encimi sušenjem ipak ne inaktiviraju potpuno i zato sprečavaju potpuni prijelaz hemoglobina u hemiglobin. Dalje se može pretpostaviti da u krvi djeluju i za vrijeme sušenja neke tvari reduktivnog karaktera kao npr. askorbinska kiselina, koje s redoks-sustavom hemoglobin-hemiglobin stvaraju redoks ravnoteže koje leže negdje kod 80% hemoglobina, i u momentu kad se krv potpuno osuši na neki način stagniraju. Osim toga, razlog može biti i u tome što je kisiku u toj fazi smanjena mogućnost difuzije zbog jednog krutog površinskog sloja pa je oksidacija usporena. Čini se da ovaj posljednji efekt igra najveću ulogu.

ZAKLJUČAK

Ispitana je reakcija nastajanja hemiglobina u krvi pri sušenju. Pokusi su rađeni u raznim eksperimentalnim uvjetima. Osim u krvi odraslog normalnog čovjeka, praćeno je stvaranje hemiglobina u krvi koja sadržava manji ili veći postotak fetalnog hemoglobina, zatim sa samim eritrocitima i u krvi u kojoj se veći dio hemoglobina nalazi kao karboksihemoglobin. U krvi životinja razlike su u upoređenju s ponašanjem krvi

čovjeka uočene od ispitivanih vrsta sisavaca samo kod pasa. Kod ptica je stvaranje hemiglobina tim putem znatno brže negoli kod čovjeka. S aspekta kemijske kinetike, utvrđeno je da se ta reakcija dešava po zakonima za kemijske reakcije I reda.

Zahvaljujem prof. dru Gorišku, Veterinarski Fakultet, Zagreb, koji nam je omogućio rad s krvlju životinja.

LITERATURA

1. Pauling L., C. Coryel: Proc. Nat. Acad. Sci. 22 (1936) 159.
2. George P., C. Stratmann: Biochem. J. 51 (1952) 103.
3. Mirsky A., M. Anson: J. Gen. Physiol. 19 (1936) 439.
4. Heubner W.: Erg. Physiol. 43 (1940) 9.
5. Paul D., R. Kemp: Proc. Soc. Exptl. Med. 56 (1944) 55.
6. Slyke D., A. Hiller, J. Weisinger, W. Cruz: J. biol. Chem. 152 (1944) 669.
7. Heilmeyer L.: Medizinische Spektralphotometrie, Verl. G. Fischer Jena 1933, str. 8, 9, 101.
8. Mikac-Dević D., K. Weber: Glasnik hemijskog društva, Bgd 26 (1961) 197.
9. Singer K., A. Chernoff, L. Singer: Blood 6 (1951) 413.
10. Cambell B.: Brit. Med. J., 2 (1952) 371.

Zusammenfassung

DIE BILDUNG DES HÄMIGLOBINS BEIM TROCKNEN VON BLUT II. DIE KINETIK DIESER REAKTION

Es wurde die Reaktion der Hämoglobinbildung beim Trocknen von Blutropfen untersucht. Der Hämiglobingehalt der Tropfen wurde mit Hilfe der differentialen Spektralanalyse bestimmt. Eine bestimmte Blutmenge wurde in flache Schalen aufgetroft und die Reaktion während der Trocknung im Verlaufe von 24 Stunden verfolgt. Aus dem Verlauf der erhaltenen Kurven (Hämiglobingehalt-Zeit) ist ersichtlich dass die Bildungsgeschwindigkeit des Hämiglobins in der ersten Stunde gering ist. In der zweiten und dritten Stunde nimmt der Hämiglobingehalt im trocknenden Blut rasch zu und erreicht den Wert von 40% vom Gesamtgehalt des Blutfarbstoffs. Beim weiteren Trocknen des Blutes erhöht sich der Hämiglobingehalt in 24 Stunden nur noch um etwa 20%. Beim Trocknen des Blutes während 8 Tagen wurden nur etwa 80% des Hämoglobins in Hämiglobin verwandelt.

Die langsame Bildung des Hämiglobins in der ersten Trocknungsphase kann damit erklärt werden, dass in dieser Phase die Reduktasensysteme, die in vivo das normale Gleichgewicht Hämoglobin - Hämiglobin aufrecht erhalten, noch wirksam sind. In der zweiten Phase inaktivieren sich immer mehr die Enzymsysteme und die Reduktion des gebildeten Hämiglobins wird dadurch immer weniger möglich. In der dritten

Trocknungsphase nimmt die Hämoglobinbildung wieder ab, was teilweise mit der Bildung einer fasten für Sauerstoff undurchlässigen Schicht auf der Oberfläche des Blutropfens erklärt werden kann.

Blutproben die mehr oder weniger fetales Blut enthielten verhielten sich bezüglich der Hämoglobinbildung analog dem normalen Menschenblut. Es wurde auch die Hämoglobinbildung im Blut, das teilweise Karboxyhämoglobin enthielt, verfolgt. Das Blut des Pferdes, der Kuh, des Kalbes und Schafes verhält sich beim Trocknen bezüglich der Hämoglobinbildung analog wie Menschenblut. Merkbare Unterschiede wurden in dieser Beziehung nur beim Blut von Hunden festgestellt. Im Vogelblut bildet sich das Hämoglobin wesentlich rascher als im Menschenblut.

Bei Anwendung der Methoden der chemische Kinetik wurde festgestellt, dass die Hämoglobinbildung während der Blutrocknung vorwiegend nach den Gesetzen der Reaktionen I. Ordnung verläuft.

*Krankenhaus »Dr. M. Stojanović«,
Medizinische Fakultät, Zagreb*

Eingegangen am 9. X. 1963.