

Methemoglobinemija

Knežević, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:782270>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Karla Knežević

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

METHEMOGLOBINEMIJA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Zagreb, 2021.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

27. srpnja 2021.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

10. rujna 2021.

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	2
2.1. Struktura, funkcija i varijante hemoglobina u eritrocitima	2
2.1.1. Struktura hemoglobina.....	2
2.1.2. Funkcija hemoglobina.....	4
2.1.3. Varijante hemoglobina.....	8
2.2. Methemoglobin: kako nastaje i zašto nekad ne nestaje.....	9
2.2.1. Autooksidacija oksihemoglobina	9
2.2.2. Uloga dušikova (II) oksida, nitrita i organskih dušikovih spojeva	10
2.2.3. Deficijencija NADH-citokrom b5-reduktaze.....	12
2.2.4. NADPH-flavin-reduktaza i deficijencija glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze	14
2.3. Regeneracija methemoglobina: kada enzimi nisu dovoljni.....	17
2.3.1. Metilensko plavo	17
2.3.2. Antioksidativna pseudoenzimska aktivnost NAD(P)H	19
2.4. Manifestacija methemoglobinemije u ljudi.....	21
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XXV

§ Sažetak

Ovaj završni rad daje kratak pregled strukture i funkcije hemoglobina i nekih njegovih varijanti s naglaskom na methemoglobin. Prikazani su glavni mehanizmi nastajanja methemoglobina *in vivo* te su objašnjeni načini regeneracije methemoglobina u živoj stanici putem sustava methemoglobin-reduktaza i primjenom pigmenta metilensko plavo. Također je objašnjena povezanost između deficijencije nekih enzima s pojavom stanja methemoglobinemije kao i manifestacija takvog stanja u ljudi.

§ 1. UVOD

Aerobnim organizmima potreban je kisik za brojne biokemijske i biološke procese, stoga je transport kisika do svake stanice ključan za održavanje života. S obzirom da se kisik slabo otapa u vodenim otopinama te se difuzijom teško prenosi do ciljnih stanica, u nekih vrsta je razvijen poseban sustav prijenosa kisika kroz organizam; vezanje na protein hemoglobin (Hb) u uvjetima visokog parcijalnog tlaka kisika, te otpuštanje u perifernim tkivima gdje je parcijalni tlak kisika nizak.¹

Osim peptidnog dijela, hemoglobin sadrži i prostetičku skupinu hem u čijem se središtu nalazi ion željeza u oksidacijskom stanju +II. Takav je hemoglobin spreman za prihvaćanje molekule kisika koja se veže na ion željeza, hemoglobin se oksigenira i nastaje *oksihemoglobin*. U trenutku kada se kisik otpusti, oksihemoglobin prelazi u *deoksihemoglobin* odnosno došlo je do reakcije deoksigenacije.

Ukoliko se prilikom procesa oksigenacije/deoksigenacije ili nekakve druge reakcije željezo iz hemoglobina oksidira iz oksidacijskog stanja +II u stanje +III hemoglobin gubi sposobnost vezanja kisika te nastaje *methemoglobin*. Methemoglobin je uvijek prisutan u eritrocitima ali u iznimno malim količinama, ne iznad 1%.² Eritrociti posjeduju vlastite mehanizme povratka methemoglobina u reducirani oblik te uz njih postoje razni enzimi čija je zadaća održavati željezo iz hemoglobina u funkcionalnom oksidacijskom stanju. Ako je udio methemoglobina u eritrocitima oko 30% ukupne količine hemoglobina, uslijedilo je stanje methemoglobinemije, a ako se udio methemoglobina popne iznad 70%, methemoglobinemija je smrtonosna. Takva se stanja postižu jedino akutnim trovanjem tvarima poput organskih spojeva dušika, nitritima te dušikovim monoksidom ili izrazitom deficijencijom nekih od enzima koji sudjeluju u procesu nastajanja reduciranih kofaktora koji su neophodni za aktivnost reduktaza, enzima koji reduciraju željezo u hemoglobinu kada se nađe u oksidacijskom stanju +III.³ Udio methemoglobina viši od 30% moguće je smanjiti tretiranjem tvarima koje su reducensi, odnosno mogu dati vlastiti elektron drugoj molekuli.

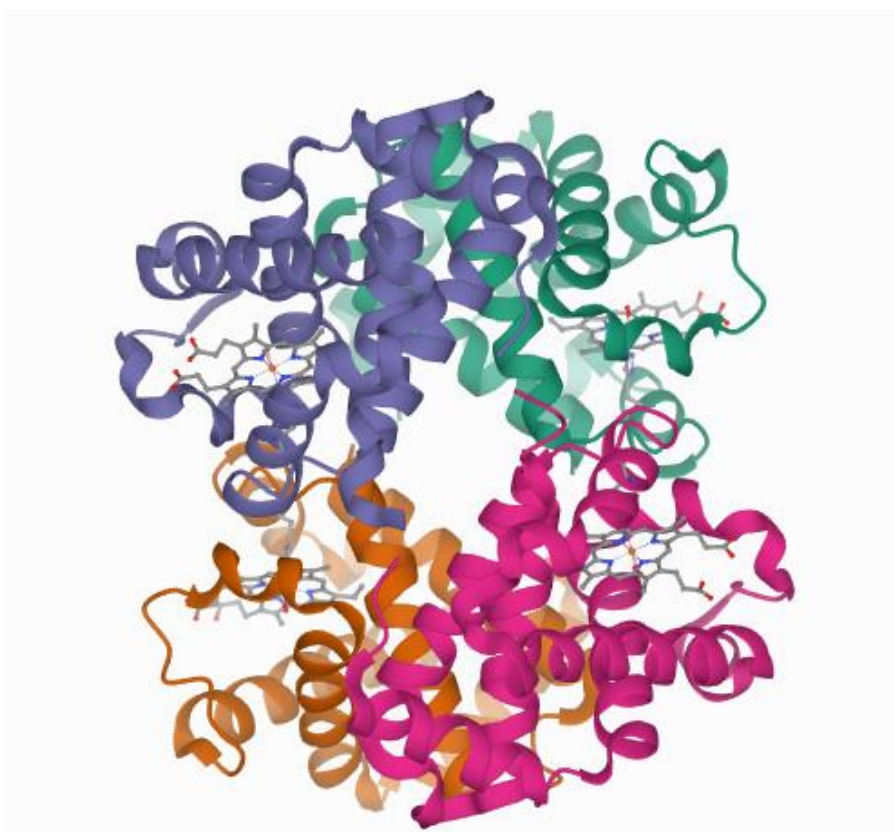
Za liječenje akutne methemoglobinemije u ljudi, primjenjuje se pigment metilensko modriko koji kroz niz redoks reakcija osigurava povratak jednog elektrona na željezo iz methemoglobina pri čemu nastaje funkcionalna molekula hemoglobina koja može prenositi kisik.⁴

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Struktura, funkcija i varijante hemoglobina u eritrocitima

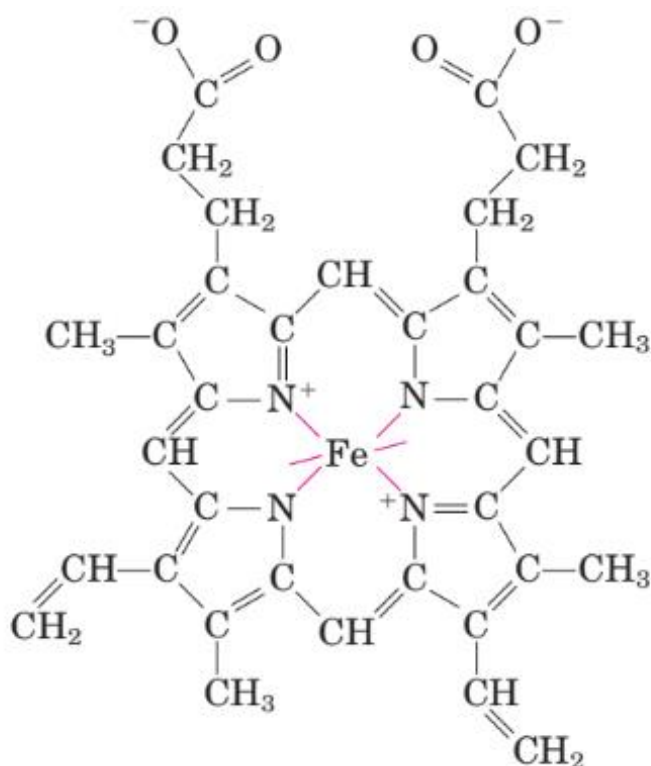
2.1.1. Struktura hemoglobina

Hemoglobin se strukturno može okarakterizirati kao heterotetramerni protein koji se sastoji od dvije α podjedinice i dvije β podjedinice. Svaka podjedinica građena je od jednog polipeptidnog lanca, a svaki od njih ima oko 140 aminokiselina gdje većina njih zauzima sekundarnu strukturu α -zavojnice. Hemoglobin pripada skupini globinskih proteina čije se podjedinice sastoje od osam α -zavojnica koje su međusobno povezane kratkim nehelikalnim slijedovima. Takve α -zavojnice, označene od A do H, se pakiraju u globularnu trodimenzionalnu strukturu. Općenito, svi globinski proteini imaju vrlo sličan prostorni razmještaj dok im se primarni slijed aminokiselina može drastično razlikovati.¹

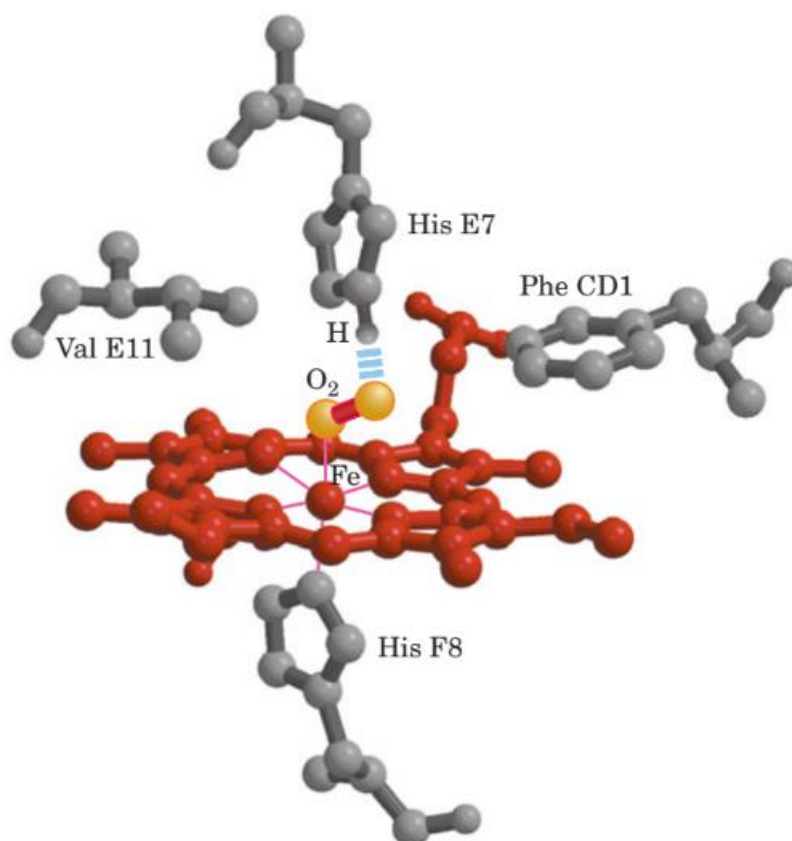


Slika 1. Struktura hemoglobina vrste *Dromaius novaehollandiae* u R-konformaciji (preuzeto iz ref. 5)

Svaka podjedinica hemoglobina sadrži jednu nekovalentno ukomponiranu prostetičku skupinu hem. Organski dio hema čini kompleksni protoporfirinski prsten dok je anorganska komponenta ion željeza u oksidacijskom stanju +II smješten u centru prstena te je koordiniran s četiri atoma dušika iz protoporfirina. Preostala dva koordinacijska mjesta željeza ne koordiniraju atomi iz hema. Jedno mjesto koordinira dušik bočnog ogranka histidina iz proteinskog dijela hemoglobina, a naziva se proksimalni histidin. Proksimalni histidin se nalazi na α -zavojnici F kao osma aminokiselina te se označava kao His F8. Na šesto koordinacijsko mjesto će se vezati kisik. Kako bi se pokušalo spriječiti vezanje drugih molekula i nastajanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) prilikom koordiniranja kisika na željezo, kisik je stabiliziran vodikovom vezom koju tvori s distalnim histidinom, His E7.¹ Bočni ogranak distalnog histidina tvori vodikovu vezu s kisikom, koji se za željezo veže pod kutem i tako osigurava čvršće vezanje. Ugljikov monoksid se za željezo veže okomito na ravninu hema te se sama molekula mora izviti radi prisutnosti distalnog histidina što osigurava manji afinitet vezanja ugljikova monoksida za hemoglobin.



Slika 2. Kemijska struktura prostetičke skupine hem sa slobodnim petim i šestim koordinacijskim mjestom (preuzeto iz ref. 1)

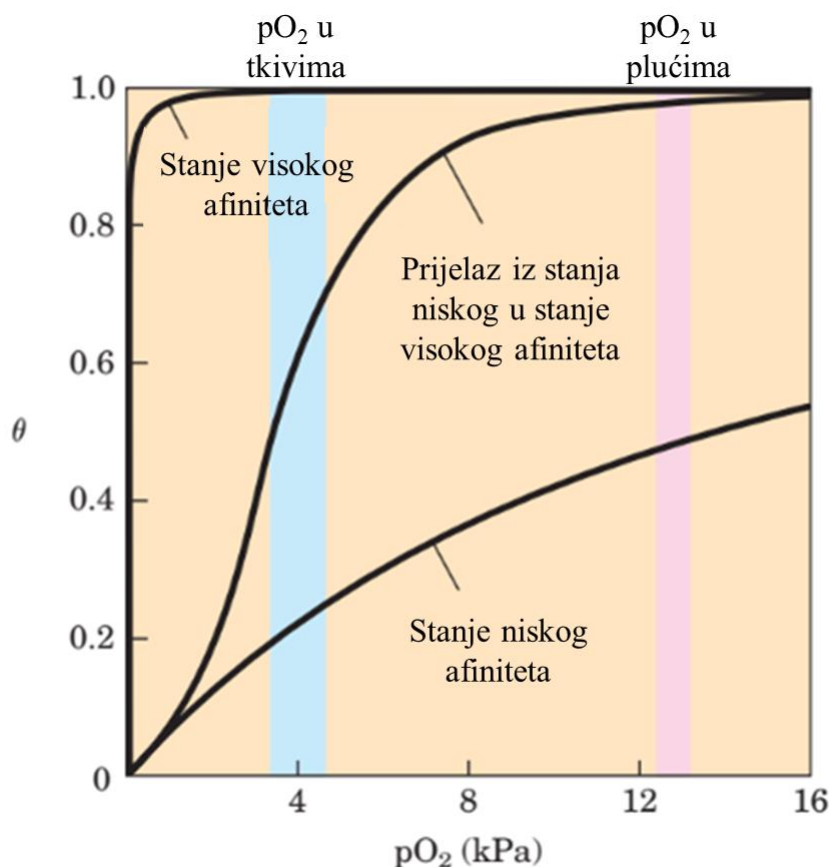


Slika 3. Prikaz koordinacije željeza iz hema prilikom vezanja kisika: crvenom bojom je označen protoporfirinski prsten, a sivom bojom aminokiselinski ostaci iz hemoglobina (preuzeto iz ref. 1)

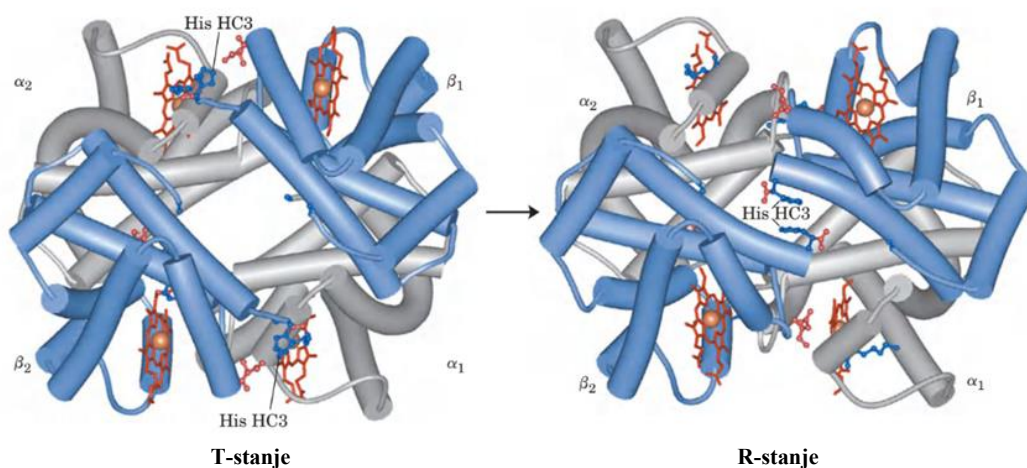
2.1.2. Funkcija hemoglobina

Glavna uloga hemoglobina u živim bićima jest transport kisika kroz organizam na način da se u uvjetima visoke zastupljenosti kisika hemoglobin oksigenira te da se deoksigenira na mjestima niske zastupljenosti kisika. Proces oksigenacije se događa u plućnim alveolama, gdje je parcijalni tlak kisika visok te u takvim uvjetima hemoglobin mora imati veliki afinitet za vezanje kisika. Hemoglobin zasićen kisikom se zatim prenosi do perifernih tkiva gdje je parcijalni tlak kisika nizak te se kisik treba otpustiti što znači da hemoglobin treba imati nizak afinitet za vezanje kisika. Mijenjanje afiniteta za vezanje plinova na hemoglobin je posljedica promjene konformacije cijelog proteina. T-konformacija hemoglobina ima nizak afinitet za vezanje kisika dok R-konformacija ima izrazito visok afinitet. Vezanje samog kisika potiče konformacijske promjene u podjedinicama hemoglobina što utječe na konformaciju čitavog proteina. Prva se molekula kisika veže slabo na jednu od podjedinica deoksihemoglobina koja

je u T-konformaciji. Vezanje prvoga kisika na jednoj podjedinici potiče konformacijske promjene na susjednim podjedinicama što utječe na afinitet za vezanje kisika. Druga molekula će se jače vezati na drugu podjedinicu hemoglobina radi konformacije koja ima veći afinitet nego početna. Treći kisik se veže s još većim afinitetom te se konačno četvrti kisik za četvrtu podjedinicu veže s najvećim afinitetom jer je njena konformacija najvećeg afiniteta za vezanje plina. Tako je hemoglobin iz T-konformacije prešao u R-konformaciju. Takav način vezanja kisika (i njegova otpuštanja) osigurava prijelaz iz stanja koje slabije veže kisik u stanje većeg afiniteta za vezanje kisika i obrnuto, što je ključno za biološku funkciju hemoglobina. Proteini kojima vezanje jednog liganda utječe na afinitet vezanja sljedećeg liganda su alosterički proteini te se takvo vezanje naziva kooperativno. Krivulja vezanja kisika na hemoglobin je sigmoidalna radi kooperativnog vezanja kisika. ^{1,6}



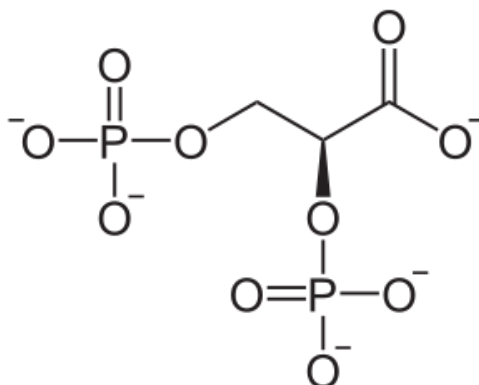
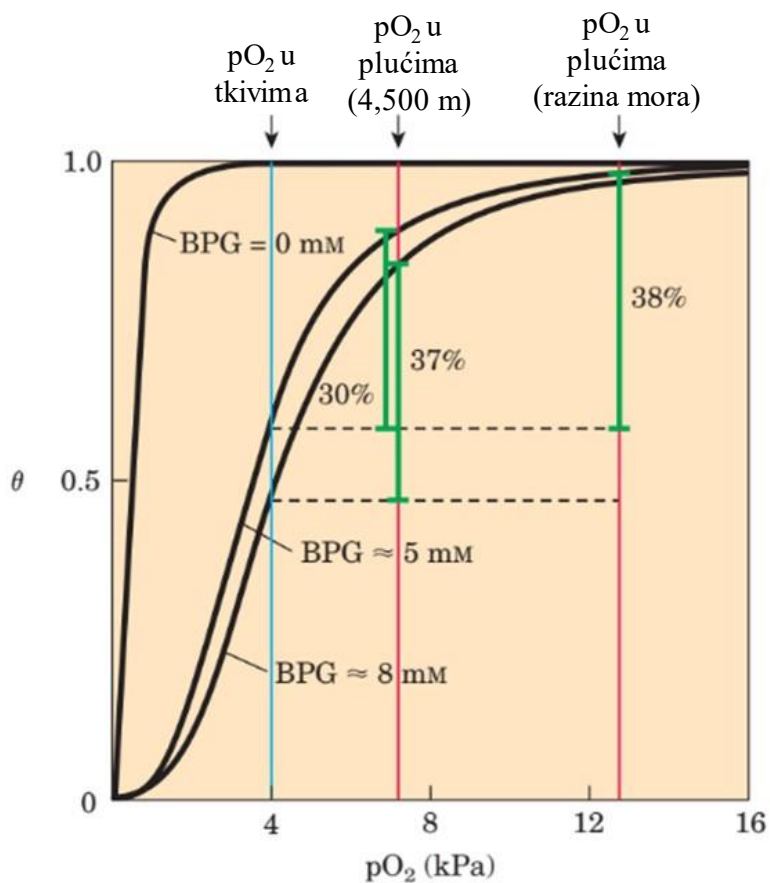
Slika 4. Krivulje vezanja kisika za hemoglobin u stanju visokog afiniteta, niskog afiniteta te kooperativnog vezanja kisika kao funkcija zasićenosti hemoglobina kisikom u ovisnosti o parcijalnom tlaku kisika (naglašeno: plavo u tkivima, ružičasto u plućima) (preuzeto i prilagođeno na hrvatski jezik iz ref. 1)



Slika 5. T-konformacija u usporedbi s R-konformacijom hemoglobina (preuzeto i prilagođeno na hrvatski jezik iz ref. 1)

Kisik je pozitivan alosterički modulator što znači da njegovo vezanje povećava afinitet za vezanje supstrata, koji je također kisik, te se zato naziva homotropnim modulatorom. Heterotropni negativni alosterički modulator je spoj 2,3-bisfosfoglicerat, BPG. Jedna molekula BPG-a se veže isključivo u centralnu šupljinu deoksihemoglobina, ostvaruje veze s aminokiselinama β -podjedinica te stabilizira stanje nižeg afiniteta, T-konformaciju. Budući da vezanje BPG-a stabilizira konformaciju s manjim afinitetom za vezanje kisika, njegova funkcija je osigurati lakše otpuštanje pri nižem parcijalnom tlaku kisika tako da se konformacija „gura“ u T-stanje.

Normalna koncentracija BPG-a u krvi čovjeka koji živi oko razine mora gdje je parcijalni tlak kisika otprilike 13 kPa je 5 mmol/L. U takvim je uvjetima hemoglobin u plućima gotovo potpuno zasićen kisikom. Prijenosom hemoglobina do perifernih tkiva u kojima je parcijalni tlak kisika znatno niži nego u plućima (4 kPa), ostvaruje se otpuštanje oko 40% vezanog kisika. Naglim smanjenjem vanjskog tlaka zraka, a samim time i smanjenjem parcijalnog tlaka kisika u plućima, postotak vezanog kisika za hemoglobin pada. U tkivima je tlak ostao nepromijenjen ali će se otpustiti znatno manje kisika nego u prethodnoj situaciji jer hemoglobin u plućima nije bio dovoljno zasićen kisikom. Nakon nekoliko dana provedenih u uvjetima veće nadmorske visine, organizam će riješiti problem manjeg otpuštanja kisika tako da će proizvoditi više BPG-a. Povećavanjem koncentracije BPG-a u eritrocitima će se osigurati veće otpuštanje kisika zbog stabilizacije T-konformacije tako da u konačnici postotak otpuštenog kisika u uvjetima niskog tlaka bude gotovo jednak onome u razini mora.⁷

Slika 6. Struktura 2,3-bisfosfoglicerata (BPG) (izrađeno u programu *ChemDraw 19.0.*)

Slika 7. Krivulja zasićenosti hemoglobina kisikom u ovisnosti o parcijalnom tlaku kisika pri različitim koncentracijama 2,3-bisfosfoglicerata s naznačenim tlakom u plućima u razini mora, pri 4 500 m i u tkivima te postotkom kisika koji se otpušta u tkivima pri određenim uvjetima (preuzeto i prilagođeno na hrvatski jezik iz ref. 1)

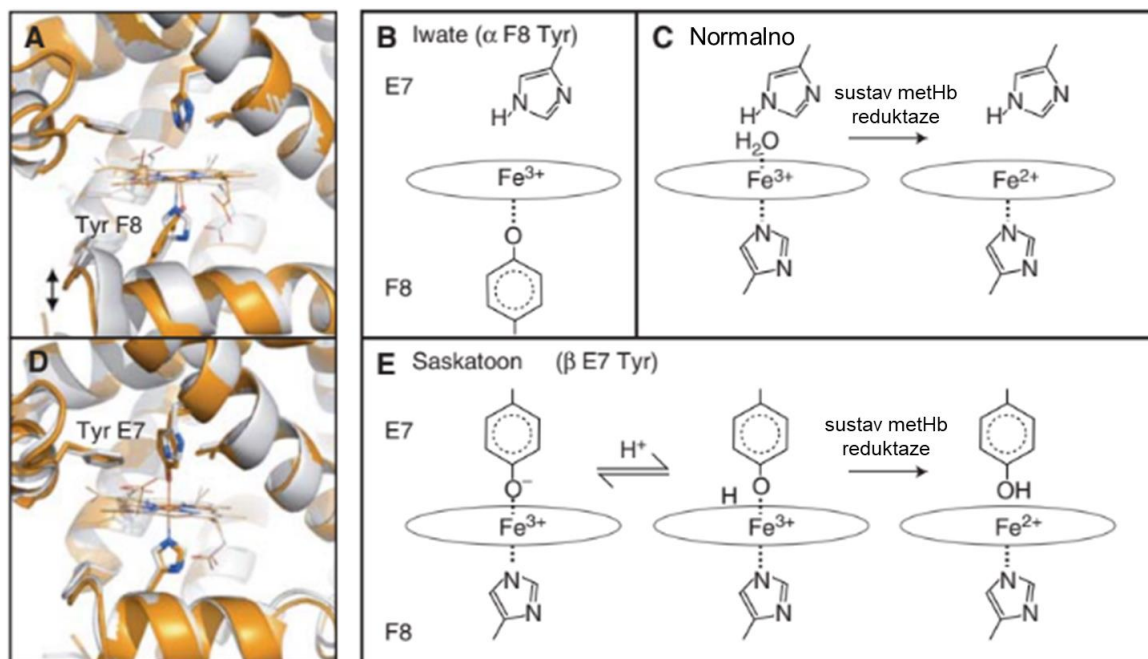
2.1.3. Varijante hemoglobina

Do sada su definirane stotine⁸ varijanti hemoglobina koje se razlikuju u jednoj ili nekoliko aminokiselina. To su genetski nasljedne varijante koje su primijećene u populacijama na određenom geografskom području po kojima su dobile i ime. Primjerice Hb Zürich na E7 mjestu β63 podjedinice je histidin zamijenjen argininom što za posljedicu ima preosjetljivost na oksidativni stres, povećan afinitet za ugljikov monoksid itd. Svaka zamjena neke aminokiseline ima gotovo isključivo negativnu posljedicu na funkcionalnost hemoglobina. Međutim, ukoliko dođe do zamjene aminokiselina sličnih svojstava, posljedice ne moraju biti opasne te čak mogu i izostati.

Jedna od najpoznatijih vrsta hemoglobina jest HbS, hemoglobin koji na jednom od β-lanaca posjeduje valin umjesto glutamata. Takva mutacija uzrokuje agregaciju hemoglobina, odnosno sljepljivanje u dugačke niti, što za posljedicu ima deformaciju eritrocita odnosno srpastu anemiju. Srpasta anemija je neizlječiva jer se HbS ne može prevesti u normalni hemoglobin.

Fetalni hemoglobin, HbF, se razlikuje od normalnog hemoglobina odraslih. Kao i normalni, fetalni hemoglobin je heterotetramer ali se sastoji od dvije α-podjedinice i dvije γ-podjedinice. Fetalni hemoglobin ima veći afinitet za vezanje kisika od normalnog radi činjenice da se BPG neće vezati na γ-podjedinice. Upravo ta promjena omogućuje fetusu da preuzima i doprema kisik iz majčine krvi u svoja ciljna tkiva.

Ukoliko se željezo iz hema oksidira u oksidacijsko stanje +III, nastaje methemoglobin, metHb. Sinteza methemoglobina ne mora biti direktna posljedica mutacije u genomu. Methemoglobin može nastati u uvjetima oksidativnog stresa u stanicama ili prilikom autooksidacije oksihemoglobina gdje nastaju reaktivne kisikove vrste. Međutim, genetske promjene koje uvjetuju nastanak hemoglobina (varijante Hb M) su primjerice zamjena proksimalnog (Hb M-Iwate) ili distalnog histidina (Hb M-Saskatoon) koji interagira s hemom pri čemu se željezo oksidira u Fe³⁺ i smanjuje aktivnost sustava methemoglobin reduktaza. Uz to, u ostalim se podjedinicama takvog hemoglobina stabilizira T-stanje odnosno smanjuje se afinitet za vezanje kisika. Pronađeno je nekoliko vrsta genetski predodređenih varijanti methemoglobina (Hb M) od kojih su najviše proučeni gore opisani Hb M-Iwate i Hb M-Saskatoon. Najvažnija funkcionalna promjena je nemogućnost methemoglobina da veže kisik.⁹



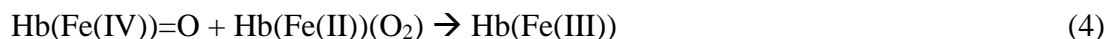
Slika 8. Struktura varijanti Hb M-Iwate i Hb M-Saskatoon (preuzeto i prilagođeno na hrvatski jezik iz ref. 9)

2.2. Methemoglobin: kako nastaje i zašto nekad ne nestaje

2.2.1. Autooksidacija oksihemoglobina

U normalnim uvjetima, prirodna zastupljenost methemoglobina u eritrocitima je ispod 1%. Oko 3% oksihemoglobina se svakodnevno prevodi u methemoglobin procesom autooksidacije (1). Prilikom vezanja kisika na ion Fe^{2+} dolazi do parcijalnog prijenosa jednog elektrona s željeznog iona na kisik pri čemu formalno nastaju Fe^{3+} i superoksidni ion O_2^- . Obično se tijekom disocijacije kisika s hemoglobina elektron vrati na željezni ion ali se u spomenutih 3% slučajeva to ne dogodi te se otpusti superoksidni ion i nastaje hemoglobin koji posjeduje Fe^{3+} ion.²

Djelovanjem enzima superoksid dismutaze će superoksidni ion biti preveden u kisik i vodikov peroksid (2) koji je izraziti oksidans te ga je potrebno ukloniti iz organizma radi sprječavanja daljnje oksidativne štete. Enzim katalaza osigurava raspad vodikova peroksida na vodu i kisik. Međutim, vodikov peroksid može oksidirati željezo iz oksihemoglobina do stanja +IV pri čemu nastaje tzv. ferilhemoglobin (3).¹⁰ Jedan od predloženih reakcijskih puteva ferilhemoglobina je komproporcioniranje (4) s oksihemoglobinom te formacija methemoglobina.¹¹



Pokazalo se da je reakcija autooksidacije brža pri niskim parcijalnim tlakovima kisika te da pri takvim uvjetima promjene u strukturi hemoglobina koje uzrokuju manji afinitet prema kisiku i prisutnost tvari koje stabiliziraju T-konformaciju (npr. BPG) također ubrzavaju autooksidaciju. Unatoč tome, potpuno deoksigenirani hemoglobin ne podliježe reakciji autooksidacije jer je za taj proces potreban molekularni kisik koji mora biti vezan na hemoglobin. Međutim, u uvjetima visokog atmosferskog tlaka te prema tome višeg parcijalnog tlaka kisika, tvari kao što su 2,3-bisfosfoglicerat nemaju utjecaja na brzinu autooksidacije. U uvjetima visokog tlaka kisika, hemoglobin će favorizirati R-konformaciju te se smatra da se autooksidacija događa u R-konformaciji, a ne prilikom prijelaza u T-konformaciju tijekom deoksigenacije kako je slučaj u uvjetima niskog tlaka.²

2.2.2. Uloga dušikova (II) oksida, nitrita i organskih dušikovih spojeva

Dušikov (II) oksid, NO, važna je signalna molekula u živome svijetu te u organizmu nastaje iz arginina djelovanjem enzima dušikov (II) oksid-sintaza. Dušikov monoksid je uvijek prisutan u stanicama te ima uloge u kontroli vazodilacije, neurotransmiterskim putevima, imunološkom odgovoru itd.¹² Kada NO uđe u crvene krvne stanice, može reagirati s hemoglobinom. Za reakciju s oksihemoglobinom, NO se prvo mora oksidirati do nitrita pomoću kisika (5), a zatim reagira s oksigeniranim hemoglobinom. Mehanizam reakcije uključuje dvije oksidacije, nitrit u nitrat i oksihemoglobin u methemoglobin, a elektroni se sele na kisik koji se reducira do molekule vode (6). Nitrat nastao ovim putem je inertni produkt metabolizma dušikova monoksida te se izlučuje van.¹³



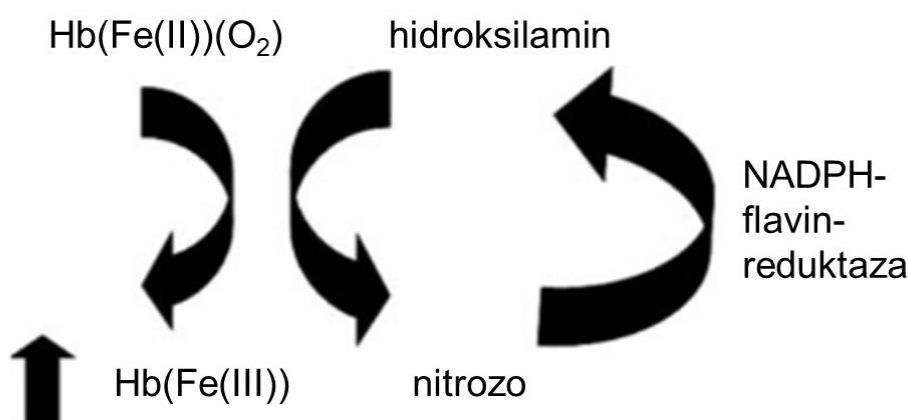
Mehanizam reakcije s deoksihemoglobinom ne uključuje kisik kao akceptor elektrona nego se iz nitrita ponovno formira dušikov monoksid (7).¹³ Oksidacija deoksihemoglobina s nitritom se

može spregnuti s redukcijom methemoglobina putem sustava methemoglobin-reduktaze pa takav slijed reakcija može služiti kao sustav nitrit-reduktaze.¹⁰



Ipak, većina nitrita prisutna u organizmu potječe iz hrane odnosno vode za piće. Prekomjeren unos nitrita i nitrata može dovesti do stanja akutne methemoglobinemije. Nitriti će oksidirati hemoglobin na već spomenuti način, a nitrati će se prevesti do nitrita djelovanjem bakterija koje žive u oralnoj šupljini. Zbog toga će konzumacija vode i povrća bogatih nitrata vrlo vjerojatno dovesti do stanja methemoglobinemije.

Jedan od najčešćih uzroka akutne methemoglobinemije u ljudi jest trovanje anilinom i njegovim derivatima. Anilin je bezbojna, uljasta tekućina koja se koristi u proizvodnji boja, herbicida te kao prekursor nekih pigmenta i poznati je karcinogen. Produkti njegova metabolizma (kao i metabolizma njegovih derivata) imaju ključnu ulogu u povećanju koncentracije methemoglobina u krvi. N-hidroksi metaboliti reagiraju s oksihemoglobinom pri čemu se otpuštaju nitrozobenzen i reaktivne kisikove vrste koje stvaraju oksidativni stres unutar stanice te se povećava proizvodnja methemoglobina pa čak i uništavanje citoskeleta. Nitrozobenzen se može vezati na deoksihemoglobin ili prevesti nazad u anilin ili u krajnjoj liniji u fenilhidroksilamin putem NADPH-flavin-reduktaze (ili glutationa) što za posljedicu ima stvaranje redoks ciklusa koji za svaki nastali fenilhidroksilamin stvara jedan ekvivalent methemoglobina. Trovanja derivatima anilina nađenim u bojama ili otapalima će uzrokovati rast udjela methemoglobina iznad 30% i kliničke simptome methemoglobinemije.^{14,15}

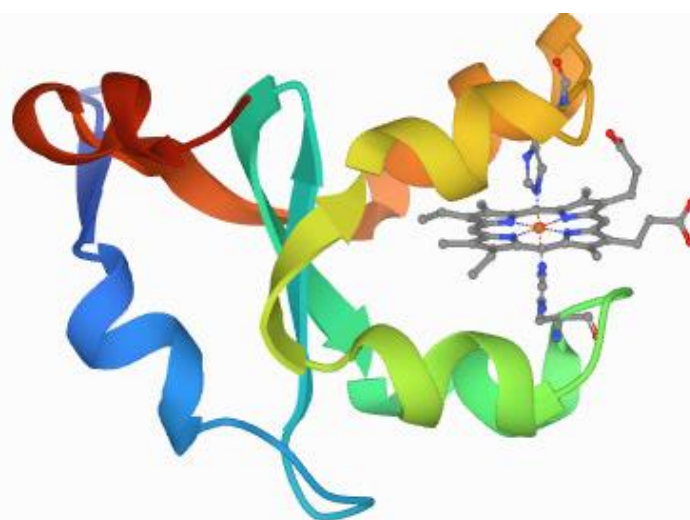


Slika 9. Redoks ciklus metabolita anilina i njegovih derivata u sintezi methemoglobina (preuzeto i prilagođeno na hrvatski jezik iz ref. 10)

2.2.3. Deficijencija NADH-citokrom b5-reduktaze

Razine methemoglobina u krvi su pod kontrolom sustava methemoglobin-reduktaza. NADH-citokrom b5-reduktaza jedan je od glavnih enzima odgovornih za recikliranje methemoglobina. Smanjenje aktivnosti ili deficijencija NADH-citokrom b5-reduktaze dovodi do nakupljanja velike količine methemoglobina u eritrocitima prilikom normalnog procesa (de)oksigenacije hemoglobina i stanja koje se naziva kongenitalna (urođena) methemoglobinemija.

Citokrom b5 je protein s elektron-transferaznom aktivnošću te može primiti i donirati jedan elektron. Nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) izvor je elektrona za prijenos posredovan proteinom citokrom b5. NADH-citokrom b5-reduktaza postoji u dvije izoforme koje posjeduju različite uloge. Prvi izozim prisutan je u eritrocitima i ima ulogu redukcije methemoglobina. Druga forma se nalazi u gotovo svim tkivima asociirana s membranom endoplazmatskog retikuluma te ima više funkcija. Neke od njih su uloga u sintezi kolesterola, elongaciji i desaturaciji masnih kiselina. Deficijencija enzima uzorkuje methemoglobinemiju, no ovisno o izozimu koji je manjkav, klinička manifestacija je drukčija. S obzirom na ulogu, deficijencija enzima vezanog za membranu uzrokuje teže simptome i mentalnu retardaciju (Tip II) dok manjak izozima prisutnog u eritrocitima uzrokuje blaže simptome vezane uz methemoglobinemiju (Tip I).^{16,17}

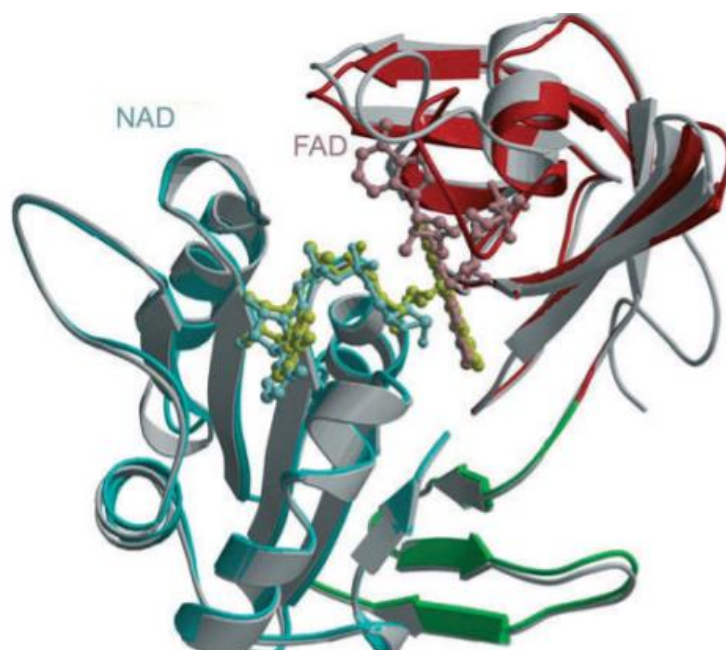


Slika 10. Struktura proteina citokrom b5 s vezanom molekulom hem iz hemoglobina iz vrste *Bos taurus* (preuzeto iz ref. 18)

Dva izozima imaju različiti primarni slijed aminokiselina. Izozim koji se veže na membranu sadrži dodatnih 25 aminokiselina koje su odgovorne za ostvarivanje interakcija s molekulama

koje sačinjavaju membrane, dok forma nađena samo u eritrocitima nema takav dio i sastoji se od 276 aminokiselina. Gen odgovoran za sintezu NADH-citokrom b5-reduktaze, *CYB5R3*, lociran je na 22. kromosomu i sastoji se od 32 kilobaze te posjeduje devet egzona. Otkrivene su brojne mutacije na genu *CYB5R3* koje uzorkuju spomenute deficijencije jednog ili drugog izozima. Pokazalo se da su točkaste mutacije uzrok pojave methemoglobinemije vezane za Tip I dok su za veliku većinu slučajeva pojave deficijencije enzima koji se prezentira kao Tip II, odgovorne mutacije vezane za mjesta prekrajanja između egzona (uglavnom između egzona 3 i 4).¹⁶

Za aktivnost NADH-citokrom b5-reduktaze prisutne u eritrocitima, potrebna je i prostetička skupina FAD. Enzim se sastoji od dvije glavne domene: N-terminalna domena veže FAD, a u C-terminalnoj domeni vezan je jedan od supstrata, NADH. Dvije domene su međusobno povezane malom linker-domenom koja se sastoji od tri antiparalelne β -ploče.¹⁹



Slika 11. Superpozicija trodimenzionalnih struktura NADH-citokrom b5-reduktaze (sivo i obojeno) iz štakora s FAD-vezujućom domenom (crveno), NADH domenom (plavo) i linker-domenom (zeleno) gdje je modelom štapića i kuglica plavom bojom prikazan vezani NAD^+ , crvenom FAD, a žutom FAD koji je neprirodno vezan u vezno mjesto za NAD^+ , preko adeninskog dijela koji je zajednički kofaktorima NADH i FAD (preuzeto iz ref. 20)

NADH-citokrom b5-reduktaza katalizira prijenos jednog elektrona s reduciranog kofaktora NADH na željezo u oksidacijskom stanju +III methemoglobina. NADH potječe iz glikolitičkog puta pretvorbe šećera glukoze u dvije molekule piruvata. Elektroni će prijeći s NADH na FAD, prostetičku skupinu NADH-citokrom b5-reduktaze, te će potom jedan elektron prijeći na sam citokrom b5 pri čemu nastaje reducirana forma enzima. Reducirani oblik enzima služi kao elektron-donor za methemoglobin pri čemu će se željezo reducirati i nastaje deoksihemoglobin.²⁰

Deficijencija ovog enzima uzrokovana mutacijama na genu *CYB5R3*, ne igra ulogu u proizvodnji methemoglobina već u održavanju njegove koncentracije u krvi niskom. Procijenjeno je da se udio methemoglobina u krvi bez aktivnosti NADH-citokrom b5-reduktaze penje na 20-25% što je dovoljno za manifestaciju blagih simptoma methemoglobinemije te je značajno više nego maksimalnih 1% koji se nalazi u eritrocitima u normalnim uvjetima. Radi genetske pozadine deficijencije (ili inaktivnosti) ovog enzima, methemoglobinemija nastala ovim putem, odnosno kongenitalna methemoglobinemija, je nasljedna te dolazi do izražaja u osoba koje su recesivni homozigoti.

2.2.4. NADPH-flavin-reduktaza i deficijencija glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze

Alternativni način redukcije methemoglobina u eritrocitima je posredovan enzimom NADPH-flavin-reduktazom koji se naziva i NADPH-methemoglobin-reduktaza. Mehanizam redukcije prvenstveno uključuje enzimski katalizirani prijenos elektrona s reduciranog kofaktora NADPH na oksidiranu formu flavina (8), a potom neenzimatsku reakciju (9) redukcije Fe^{3+} iz methemoglobina prelaskom elektrona s reduciranog flavina na željezo. Pri tome, flavin predstavlja grupu organskih molekula koje posjeduju tzv. flavinsku skupinu koja se sastoji od tri prstena kondenzirana u jedan heterociklički sustav, a razlikuju se po alkilnom ogranku na desetom atomu. Tako sudionici ove reakcije mogu biti FAD i FMN, flavini koji posjeduju ribonukleotide ili riboflavin, vitamin B2, koji na desetom atomu ima vezan šećer ribozu. Pokazalo se da flavin nije prostetička skupina NADPH-flavin-reduktaze već se kao slobodna molekula veže kao supstrat ovoga enzima. Važno je napomenuti da ovaj enzim može koristiti i druge supstrate slične strukture koji imaju oksidativna svojstva umjesto flavina, primjerice pigment metilensko plavo o kojem će riječi biti kasnije, ali su flavini prirodno prisutni u eritrocitima i stoga prvi izbor enzimu.²¹

Tablica 1. Usporedba brzine redukcije methemoglobina dvama enzimima: NADPH-flavin-reduktazom uz različite koncentracije FAD i FMN te NADH-citokrom b5-reduktazom različite koncentracije citokroma b5 u (an)aerobnim uvjetima²²

Enzim	$c(\text{supstrat})/\mu\text{mol/L}$	O ₂	$v_0/\text{nmol/L}$	Relativna aktivnost/ %	
NADPH-flavin reduktaza	FMN; 0,1	-	0,38	1,5	/
	FMN; 1,0	-	4,36	17,5	/
		+	2,32	/	9,2
	FAD; 1,0	-	0,92	3,7	/
		+	0,69	/	2,7
NADH-citokrom b5-reduktaza	Citokrom b5; 1,04	-	24,9	100	/
		+	25,2	—	100

Iz tablice 1. je vidljivo da u slučaju redukcije methemoglobina NADPH-flavin-reduktazom viša koncentracija flavina uvjetuje bržu reakciju, a FMN je supstrat koji će osigurati veću brzinu reakcije. Također se iz eksperimenta koji su proveli Yubisui et al može potvrditi da je redukcija methemoglobina ovim enzimom od sporednog značaja u stanicama jer čak i u uvjetima najveće koncentracije flavina u eritrocitima (1 $\mu\text{mol/L}$), brzina je za nekoliko desetaka puta manja od brzine redukcije NADH-citokrom b5-reduktazom.

Enzim NADPH-flavin-reduktaza funkcionira isključivo u uvjetima gdje je dostupan kofaktor NADPH. U stanicama se NADPH generira u putu pentoza-5-fosfata, metaboličkom putu u koji je ključan za sam metabolizam eritrocita, ali i za nastajanje reduciranih kofaktora te prekursora DNA, RNA itd. Funkcije kofaktora NADPH su brojne; ima ključnu ulogu u biosintezi nekih bioloških molekula kao što su masne kiseline, prostetička je skupina nekih enzima te sudjeluje u neutralizaciji nastale oksidativne štete u stanicama, poglavito u eritrocitima reducirajući reaktivne kisikove vrste kao što su superoksidni ion, vodikov peroksid itd. Istodobno služi kao izvor elektrona za enzim glutation-reduktazu koji će regenerirati glutation, molekulu koja također ima važnu ulogu u protekciji od oksidativnog stresa. NADPH će se generirati iz dvije reakcije u putu pentoza-fosfata. Prva reakcija (ujedno i prva reakcija puta pentoza-fosfata) je pretvorba glukoze-6-fosfat u 6-fosfoglukonolakton koju katalizira enzim glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza (G6PD) te generiranje jedne molekule NADPH, a druga je reakcija oksidacije 6-fosfoglukonata u ribulozu-5-fosfat enzimom 6-fosfoglukonat-dehidrogenaza uz proizvodnju druge molekule NADPH.²³

Manjkavost glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze (G6PD) u crvenim krvnim stanicama najčešća je deficijencija bilo kojeg od enzima u eritrocitima. Deficijencija G6PD onemogućit će odvijanje puta pentozna-fosfata, a samim time i proizvodnju reduciranog kofaktora NADPH. Rezultat takvog stanja je hemolitička anemija odnosno hemoliza, proces u kojem se eritrociti raspadaju brže nego što nastaju radi nemogućnosti kontroliranja oksidativne štete u samoj stanici. Manjak G6PD kao direktnu posljedicu ima onemogućeno funkcioniranje enzima NADPH-flavin-reduktaze te se mehanizam redukcije methemoglobina ovim putem sigurno neće odvijati. No kao što je navedeno, u normalnoj stanici, redukcija ovim mehanizmom nije glavni način regeneracije methemoglobina nego se provodi kao alternativna opcija. Međutim, u abnormalnim uvjetima, primjerice deficijenciji NADH-citokrom b5-reduktaze, methemoglobin će se regenerirati gotovo isključivo ovim putem stoga je pojava methemoglobinemije u uvjetima smanjene koncentracije glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze, sigurna.²¹

2.3. Regeneracija methemoglobina: kada enzimi nisu dovoljni

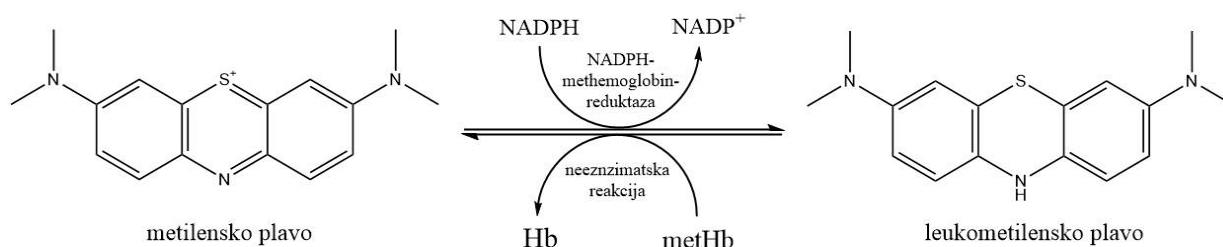
2.3.1. Metilensko plavo

Kako bi se methemoglobin vratio natrag u hemoglobin koji može prenositi kisik, potrebno je reducirati željezo iz oksidacijskog stanja +III u stanje +II. U normalnim uvjetima, eritrociti su opremljeni sustavom methemoglobin-reduktaza, enzima čiji je zadatak održavati razine metHb vrlo niskima. Glavni enzimi s takvom funkcijom su NADH-citokrom b5-reduktaza i NADPH-flavin-reduktaza. Svaki se dan 3% ukupnog hemoglobina u organizmu prevede u methemoglobin, a sustav methemoglobin-reduktaza osigurava da konačna koncentracija ove forme hemoglobina ostane ispod 1%. Kada se razina metHb popne iznad 20-30%, enzimi više ne mogu vratiti sav methemoglobin natrag u funkcionalni oblik te se on zadržava u većim količinama u krvi. U takvim se slučajevima obično radi o akutnim methemoglobinemijama uzrokovanih unosom tvari koje imaju oksidativno djelovanje kao što su nitriti, razni lijekovi, derivati anilina itd. te deficijencijama enzima koji posredno ili neposredno sudjeluju u održavanju razina metHb u krvi normalnim. Zbog toga je stanice potrebno opskrbiti tvarima koje će inhibirati oksidaciju hemoglobina ili sudjelovati u redukciji methemoglobina.

Glavna tvar koja se koristi za regeneraciju methemoglobina je metilensko plavo odnosno metilensko modrilo (MB). Metilensko modrilo komercijalni je naziv za spoj tetrametilitionin-klorid čija se struktura sastoji od heterocikličkog sustava tri kondenzirana

aromatska prstena koji je pri sobnoj temperaturi tamnomodra kristalična sol dobro topljiva u vodi. Energija prijelaza π -elektrona ovakvog aromatskog sustava odgovara energiji elektromagnetskog zračenja u vidljivom dijelu spektra te će ovaj spoj propuštati valne duljine u plavom dijelu spektra. Ta činjenica zaslužna je za razne primjene metilenskog plavog kao pigmenta u medicini, biologiji i kao bojila u industriji. Metilensko plavo postoji u oksidiranom (MB) i reduciranom obliku koji nosi naziv leukometilensko plavo (leukoMB) no kontradiktorno svom imenu, nije obojena tvar jer ne apsorbira svjetlost u vidljivom dijelu spektra i za razliku od metilenskog modrog, nema naboja. Metilensko i leukometilensko plavo zajedno čine reverzibilni redoks sustav koji je uz nisku toksičnost za ljude zaslužan za primjenu prilikom liječenja ozbiljnijih stanja methemoglobinemije.²⁴

Otopina metilenskog modrila se unese u krvožilni sustav gdje se djelovanjem NADPH-methemoglobin-reduktaze reducira u leukoMB. S obzirom na lipofilna svojstva nastale molekule, ona se može transportirati običnom difuzijom preko plazma membrane u unutrašnjost stanice. LeukoMB posjeduje redukcijska svojstva te će neenzimatskom reakcijom jedan elektron prenijeti na željezo u oksidacijskom stanju +III iz methemoglobina te će se tako regenerirati funkcionalni hemoglobin ali i molekula metilenskog plavog.²⁵



Slika 13. Redoks sustav metilenskog plavog i leukometilenskog plavog u funkciji redukcije methemoglobina u hemoglobin (izrađeno u programu *ChemDraw 19.0.*)

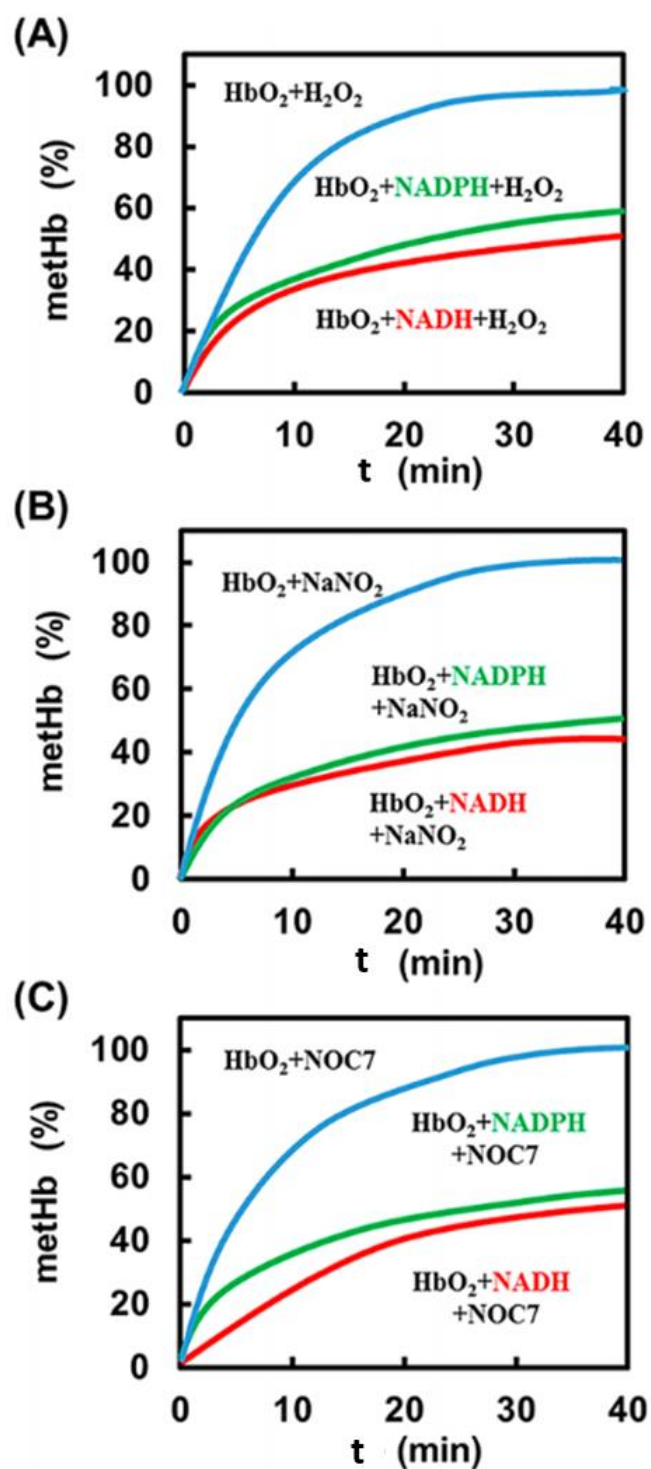
Mehanizam redukcije methemoglobina putem metilenskog modrila zahtijeva reducirani kofaktor nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat, NADPH, kako bi se reducirao u leukoMB koji može prenijeti elektron na methemoglobin. Unatoč činjenici da je MB prvi izbor u liječenju methemoglobinemije, u određenim slučajevima može prouzročiti pojavu visoke koncentracije metHb u krvi. U deficijenciji enzima glukoza-6-fosfat-dehidrogenaze, administracija metilenskog modrila će izazvati methemoglobinemiju jer je inhibiran put pentoza-fosfata koji je ključan za proizvodnju NADPH u eritrocitima. Ukoliko se MB ne reducira pomoću NADPH-methemoglobin(flavin)-reduktaze, neće moći reducirati željezo u methemoglobinu i ostat će u

formi koja pokazuje bolja oksidativna nego reducirajuća svojstva. Nakupljanje metilenskog modrila u oksidiranoj formi utječe na povećani oksidativni stres u eritrocitima, a u kombinaciji s manjkom enzima G6PD može prouzročiti uništavanje crvenih krvnih stanica odnosno hemolitičku anemiju.²⁵

2.3.2. Antioksidativna pseudoenzimska aktivnost NAD(P)H

NADH i NADPH su izvori elektrona u reakcijama redukcije methemoglobina putem NADH-citokrom b5-reduktaze i NADPH-flavin-reduktaze. Međutim, pokazalo se da NADH i NADPH posjeduju značajna antioksidativna svojstva kada se nađu u visokim koncentracijama u prisutnosti oksihemoglobina. Normalni eritrociti u krvi posjeduju enzime koji su zaslužni za sprječavanje oksidativne štete djelovanjem reaktivnih kisikovih vrsta kao što su superoksidni ion te vodikov peroksid. Enzim superoksid-dismutaza (SOD) katalizira reakciju disproporcioniranja superoksidnog iona u kojoj nastaju molekularni kisik i vodikov peroksid. Katalaza (CAT) ima ulogu u raspadu vodikova peroksida na kisik i vodu. U uvjetima bez enzima, u umjetnim eritrocitima odnosno vezikulama hemoglobina (Hb-V), uočena je pseudo-SOD i pseudo-CAT aktivnost reduciranih kofaktora NADPH i NADH kao i inhibitorna svojstva pri formiranju methemoglobina u prisutnosti nekih tipičnih oksidansa.²⁶

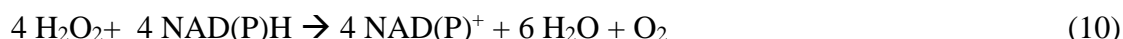
U umjetnim eritrocitima koji ne sadrže niti jedan protein osim hemoglobina, dodatkom oksidansa natrijeva nitrita (NaNO_2), vodikova peroksida (H_2O_2) i 1-hidroksi-2-okso-3-(*N*-metil-3-aminopropil)-3-metil-1-triazena (NOC7), spoja koji u vodenim otopinama generira dušikov monoksid (NO), potvrđena je značajna inhibicija nastajanja methemoglobina. Oksihemoglobin u eritrocitima koji su sadržavali samo oksidanse, je gotovo sav u roku od 40 minuta oksidirao do methemoglobina. Udio nastalog methemoglobina u prisutnosti NADPH u vezikulama s H_2O_2 je iznosio 53% , s NaNO_2 47%, a u eritrocitima s prisutnim NOC7 63%. Rezultati dobiveni u uvjetima visoke koncentracije NADH su bili slični, no ipak malo bolji. Taj se podatak može pripisati boljoj termalnoj stabilnosti NADH koja će inhibirati redukciju hemoglobina dulje vremena pri fiziološkim uvjetima temperature 37°C i $\text{pH}=7,4$.²⁶



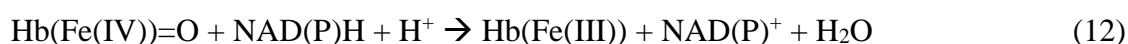
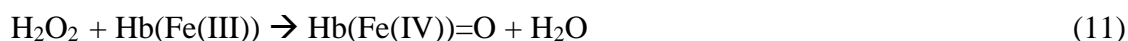
Slika 14. Udio methemoglobina u umjetnim eritrocitima sa i bez NADH i NADPH u vremenu uz dodatak oksidansa (A) H₂O₂ (B) NaNO₂ (C) NOC7 (preuzeto iz ref. 26)

Otkrivena je pseudoenzimatska aktivnost NADH i NADPH kada sami koegzistiraju s hemoglobinom. Prilikom autooksidacije hemoglobina nastaje superoksidni anion koji može dalje reagirati s oksihemoglobinom pri čemu kao nusprodukt nastaje vodikov peroksid ili se sam može raspasti u vodikov peroksid koji će dalje oksidirati hemoglobin.

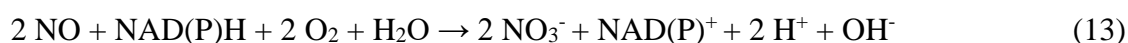
Sam NAD(P)H može stupiti u reakciju s vodikovim peroksidom i prevesti ga u vodu i kisik te tako ubrzati njegov raspad.



U prisutnosti oksihemoglobina je otkrivena jača pseudokatalazna aktivnost kofaktora čiji mehanizam uključuje nastanak ferilhemoglobina iz methemoglobina i vodikova peroksida te zatim redukciju ferilHb uz regeneraciju metHb ali i raspad vodikova peroksida na vodu.



Dušikov monoksid će u reakciji s oksihemoglobinom dati methemoglobin i nitrate. NAD(P)H reagira s dušikovim monoksidom u aerobnim uvjetima te ga prevodi do nitrata.



Nitriti će također prevesti oksihemoglobin u methemoglobin uz nusprodukte dušikov monoksid i vodikov peroksid. Daljnja se oksidacija nastalim produktima sprječava pseudo-CAT aktivnošću NAD(P)H (11 i 12) i reakcijom NAD(P)H s NO (13).²⁶

2.4. Manifestacija methemoglobinemije u ljudi

Vidljive posljedice stanja methemoglobinemije se mogu uočiti tek kada je udio methemoglobina u krvi viši od 20%. Osim ozbiljnih mentalnih poteškoća koje su posljedica deficijencije enzima NADH-citokrom b5-reduktaza tip II, simptomi methemoglobinemije generalno prate simptome drugih vrsta anemija kao što su umor, glavobolja, vrtoglavica i kratak dah zato što se u načelu također radi o manjoj zasićenosti krvi i stanica kisikom. Međutim, postoje i druge pojave koje bi mogle dati sigurnu informaciju da se radi o povišenoj

koncentraciji methemoglobina bilo da se radi o nasljednim tipovima bolesti ili akutnim stanjima.²⁷

Čokoladno smeđa krv posljedica je povišene razine oksidiranog hemoglobina u krvi. Boja krvi ukazuje na stanja u kojima se hemoglobin nalazi. Tako je deoksihemoglobin tamnocrvene boje, a oksihemoglobin jarkocrvene boje dok radi različitih apsorpcijskih svojstava, methemoglobin uzrokuje promjenu boje krvi u smeđu. Usporedbom boje krvi osobe koja ima methemoglobinemiju s kontrolnim uzorkom se može uočiti jasna razlika. S vremenom se normalna krv, odnosno hemoglobin, oksidira kisikom iz zraka te nastaje methemoglobin i smeđe obojan uzorak tako da treba biti oprezan s izlaganjem kontrolnog uzorka zraku prije usporedbe.²⁷



Slika 15. Usporedba krvi osobe kojoj je dijagnosticirana methemoglobinemija (lijevo) i kontrolnog uzorka normalne krvi (desno) na bijelom papiru (preuzeto i prilagođeno na hrvatski jezik iz ref. 28)

Drugi simptom, koji se također veže uz gotovo sve oblike anemije ali je stekao „popularnost“ u kontekstu methemoglobinemije je plava koža odnosno stanje cijanoze. Cijanoza je posljedica abnormalno niskih razina kisika u krvi te se manifestira kao plavkasta diskoloracija kože oko usana, unutrašnjosti usta i perifernih udova. Deoksigenirana krv u venama se kroz kožu čini plava ili zelena, ali kao što je rečeno, u stvarnosti je tamnocrvena. Tako se u stanju niske

zasićenosti kisikom, kapilare blizu površine kože ispunjavaju deoksigeniranom krvlju koja će kožu činiti plavom.²⁹ Najpoznatiji slučaj cijanoze je vjerojatno vezan uz obitelj Fugate iz Kentuckyja. Osnivač obitelji koji se doselio u Ameriku je pukim slučajem oženio ženu s genom za istu bolest koja je uzrokovala njegovu plavu kožu. Zbog izolacije u brdima američkog istoka i osude tadašnjeg društva radi plave kože, obitelj je kroz nekoliko generacija pribjegavala incestu zbog čega su gotovo svi članovi naslijedili urođenu methemoglobinemiju tip I. Obitelj je nosila gen za deficijenciju enzima NADH-citokrom b5-reduktaze koji je recesivan i stoga je bio češće izražen radi prokreacije bliskih rođaka. Zbog toga je u obitelji Fugate rasla koncentracija methemoglobina u krvi, a koža bila plava. Nisu imali ozbiljnijih posljedica po zdravlje ali je njihovo stanje doprinijelo razumijevanju i definiranju nasljednih oblika methemoglobinemije.³⁰



Slika 16. Cijanoza jezika i usni u osobe s 25-30% methemoglobina u krvi (preuzeto iz ref. 28)



Slika 17. Portret obitelji iz 19. stoljeća s nasljednim stanjem manjka enzima NADH-citokrom b5-reduktaze nazvani „Plavi Fugatei iz Kentuckyja“ (preuzeto iz ref. 30)

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Leininger: Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, 2008, str. 153-162.
2. A. Mansouri, *Am. J. Med. Sci.* Vol. 289, **5** (1985) 200-209.
3. R. Hoffman, E. J. Benz Jr, L. E. Silberstein et al, *Hematology: Basic Principles and Practice*, Elsevier, Philadelphia, 2018, str. 608–615.
4. H. Sakai, B. Li, W. L. Lim, Y. Iga, *Bioconjugate Chem.* **25** (2014) 1301-1310.
5. *Crystal structure of Emu (dromaius novaehollandiae) hemoglobin at 2.3 angstrom resolution*, 2. srpnja 2014., *Protein Data Bank*, <https://www.rcsb.org/structure/3WTG> (datum pristupa 9. srpnja 2021.)
6. W. A. Eaton, E. R. Henry, J. Hofrichter, A. Mozzarelli, *Nat. Struct. Biol.* **6** (1999) 351–358.
7. R. Macdonald, *Anaesthesia* **32** (1977) 544–553.
8. <https://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter> (datum pristupa 9. srpnja 2021.)
9. C. S. Thom, C. F. Dickson, D.A. Gell, M. J. Weiss, *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* **3** (2013) 1-22.
10. J. Umbreit, *Am. J. Hematol.* **82** (2007) 134–144.
11. C. Giulivi, K. J. A. Davies, *J. Biol. Chem.* **265** (1990) 19453–19460.
12. E. Culotta, D. Koshland, *Science*, **258** (1992) 1862–1865.
13. M. Nujić, M. Habuda-Stanić, *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku* **6** (2017) 63-73.
14. H. Sinhg. E. Purnell, C. Smith, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **58** (2007) 275-285.
15. B. Anić, S. Pleština, R. Radonić, M. Vidović, D. Bosnić, *Arh. Hig. Rada Toksikol* **50** (1999) 193–199.
16. V. Gupta, A. Kulkarni, P. Warang, R. Devendra, A. Chiddawar, P. Kedar, *Hum. Mutat.* **41** (2020) 737-748.
17. G. Vergères, L. Waskell, *Biochimie* **77** (1995) 604–620.
18. <https://www.rcsb.org/structure/1cyo> (datum pristupa 14. srpnja 2021.)
19. S. Bando, T. Takano, T. Yubisui, K. Shirabe, M. Takeshita, A. Nakagawa, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **60** (2004) 1929–1934.

20. M. J. Percy, T. R. Lappin, *Br. J. Haematol.* **141** (2008) 298-308.
21. T. Yubisui, T. Matsuki, K. Tanishima, M. Takeshita, Y. Yoneyama, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **76** (1977) 174–182.
22. T. Yubisui, M. Takeshita, Y. Yoneyama, *J. Biochem.* **87** (1980) 1715–1720.
23. M. Cappellini, G. Fiorelli, *Lancet* **371** (2008) 64–74.
24. M. Oz, D. E Lorke, M. Hasan, G. A. Petroianu, *Med. Res. Rev.* **31** (2010) 93–117.
25. E. M. McDonagha, J. M. Bautistac, I. Youngsterd, R. B. Altmanb, T. E. Klein, *Pharmacogenet. Genomics* **23** (2013) 498–508.
26. M. Yamada, T. Matsuhira, K. Yamamoto, H. Sakai, *Biochemistry* **58** (2018) 1400-1410.
27. M. P. Estey, G. Clarke, W. Sia, E. Toor, T. N. Higgins, *Clin. Chem.* **61** (2015) 466-470.
28. D. J. Trivedim, B. Joshiraj, V. Bidkar, R. Rao, *Ind. J. Clin. Biochem.* **32** (2017) 248-250.
29. <https://www.narayanahealth.org/cyanosis/> (datum pristupa 20. srpnja 2021.)
30. <https://dnascience.plos.org/2016/09/22/finding-the-famous-painting-of-the-blue-people-of-kentucky/> (datum pristupa 20. srpnja 2021.)