



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI  
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI  
PROTECȚIEI SOCIALE  
AMPOSDRU



Fondul Social European  
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale  
2007-2013



MINISTERUL  
EDUCAȚIEI  
CERCETĂRII  
TINERETULUI  
ȘI SPORTULUI

OIPOSDRU



UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI  
CLUJ-NAPOCA



UNIVERSITATEA "BABEȘ-BOLYAI"  
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică



# Substitute de sânge și interacțiunea acestora cu agenții de stres oxidativ și nitrozativ

-rezumatul tezei de doctorat-

Doctorand: **Violeta-Florina Deac (căs. Scurtu)**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Ionel Haiduc**

Cluj-Napoca, 2012



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI  
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI ȘI  
PROTECȚIEI SOCIALE  
AMPOSDRU



Fondul Social European  
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale  
2007-2013



MINISTERUL  
EDUCAȚIEI  
CERCETĂRII  
TINERETULUI  
ȘI SPORTULUI

OIPOSDRU



UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI  
CLUJ-NAPOCA

*Investește în oameni !*

FONDUL SOCIAL EUROPEAN

Programul Operațional Sectorial pentru Dezvoltarea Resurselor Umane 2007 – 2013

**Axa prioritară 1.** Educația și formarea profesională în sprijinul creșterii economice și dezvoltării societății bazate pe cunoaștere

**Domeniul major de intervenție 1.5.** Programe doctorale și postdoctorale în sprijinul cercetării

Contract nr: POSDRU/88/1.5/S/60185: „STUDII DOCTORALE INOVATIVE ÎNTR-O SOCIETATE BAZATĂ PE CUNOAȘTERE”

## CUPRINS

<b>Lista Figurilor.....</b>	<b>iv</b>
<b>Lista Schemelor.....</b>	<b>viii</b>
<b>Lista Tabelelor.....</b>	<b>ix</b>
<b>Mulțumiri.....</b>	<b>x</b>
<b>Capitolul 1. Studiu de literatură.....</b>	<b>1</b>
1.1. Structura și reactivitatea hemoglobinei.....	1
1.1.1. Reacții redox ale globinelor.....	3
1.1.1.1. Reacția dintre hidroperoxizi și hem.....	4
1.1.1.2. Reacția hemoglobinei cu NO.....	5
1.2. Necesitatea substitutelor de sânge.....	7
1.3. Hemoglobine modificate.....	11
1.3.1. Modificări intramoleculare.....	11
1.3.1.1. Modificări la capătul N-terminal.....	11
1.3.1.2. Modificări la nivelul situsului de legare al BPG-ului.....	13
1.3.2. Polimerizarea (sau reticularea intermoleculară).....	16
1.3.2.1. Polimerizarea cu glutaraldehidă.....	17
1.3.2.2. Polimerizarea cu glicolaldehidă.....	18
1.3.2.3. Polimerizarea cu oATP (adenozin trifosfat oxidat).....	19
1.3.2.4. Polimerizarea cu dietil malonimidat (imidoesteri).....	20
1.3.2.5. Polimerizarea cu rafinoză.....	21
1.3.2.6. Derivatizarea cu diaspirină (DCL-Hb).....	21
1.3.2.7. Polimerizarea ”zero-link”.....	22
1.3.2.8. Copolimerizarea cu enzime.....	23
1.3.3. Conjugarea (polimerizarea) proteinelor.....	24
1.3.3.1. Conjugarea cu dextransi.....	24
1.3.3.2. Pegalarea hemoglobinei.....	26
1.3.3.3. Conjugarea cu hidroxietilamidon (HES).....	30
1.3.3.4. Conjugarea cu inuline.....	30
1.3.4. Încapsularea hemoglobinei.....	31
1.3.4.1. Hb încapsulată în lipozomi.....	31
1.3.4.2. Hemoglobina încapsulată în nanocapsule/membrane polimerice biodegradabile.....	35
1.4. Modificarea hemoglobinei prin inginerie genetică.....	37
1.5. Alternative la hemoglobina bovină și umană.....	39
1.6. Alternative la hemoglobinele modificate.....	41
1.6.1. Compușii organici de tip perfluorocarburi.....	41
1.6.2. Substitute de sânge bazate pe grupări heminice.....	41
1.6.3. Substitute de sânge pe bază de hemeritrină.....	42
1.6.4. Celule stem.....	42
1.7. Concluzii.....	43
<b>Capitolul 2. Rezultate experimentale.....</b>	<b>44</b>
2.1. Materiale și metode.....	44
2.2. Activitatea ascorbat peroxidază în hemoglobină: afinitate remarcabilă pentru ascorbat.....	52
2.3. Reacția de derivatizare.....	60
2.3.1. Derivatizarea hemoglobinei cu reactivi dialdehidici.....	61
2.3.1.1. Derivatizarea Hb cu glutaraldehidă.....	61
2.3.1.2. Copolimerizarea hemoglobinei cu glutaraldehidă.....	69

2.3.1.2.1. Copolimerizare cu BSA.....	69
2.3.1.2.2. Copolimeri cu rubreritrină.....	72
2.3.1.3. Derivatizarea hemoglobinei cu reactivi dialdehidici generați prin oxidare cu periodat.....	73
2.3.1.3.1. Derivatizarea cu oATP.....	74
2.3.1.3.2. Derivatizarea cu amidon.....	76
2.3.1.3.3. Derivatizarea cu PEG.....	78
2.3.1.3.4. Derivatizarea cu alginat.....	81
2.3.1.3.5. Copolimerizarea hemoglobinei cu oATP.....	85
2.3.2. Derivatizarea hemoglobinei într-un singur pas.....	90
2.3.2.1. PEG-ilarea hemoglobinei.....	90
2.3.2.2. Derivatizarea cu DSS.....	95
2.4. Derivatizarea unor alternative la Hb bovină.....	99
2.5. Interacțiunea transportorilor de oxigen pe bază de hemoglobină cu monoxidul de azot (NO), respectiv cu azotitul (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ).....	108
2.5.1. Interacțiunea Hb cu NO.....	108
2.5.2. Interacțiunea Hb cu NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	110
2.6. Stabilitatea transportorilor de oxigen pe bază de hemoglobină la agenți denaturanți.....	115
2.7. Substitute de sânge pe bază de hemeritrină.....	119
2.7.1. Teste în sisteme animale.....	119
2.8. O nouă specie feroasă, hexacoordinată, în hemoglobină.....	121
<b>Capitolul 3. Concluzii.....</b>	<b>126</b>
<b>Referințe.....</b>	<b>128</b>
Anexă.....	137

**Cuvinte cheie:** hemoglobina, ascorbat, peroxid, substitute de sânge, stres oxidativ, radical liber, albumina serică bovină, reactivi dialdehidici generați prin oxidare cu periodat, polietilenglicol, disuccinimidil suberat

## Reacția de derivatizare

În majoritatea cazurilor, hemoglobina derivatizată a fost obținută urmând etapele descrise în schema de mai jos. Totuși, reactivul folosit este cel care dictează etapele necesare; în schema de mai jos, colorați în albastru, sunt pași facultativi, în sensul că ei lipsesc sau nu din reacție, în funcție de reactivul folosit. Astfel, reacția de oxidare cu periodat de sodiu ( $\text{NaIO}_4$ ) este necesară doar pentru unii reactivi – cei cu grupări hidroxilice – precum ATP, polietilenglicolul, amidonul, alginat; de asemenea introducerea moleculelor cu rol antioxidant este un pas opțional, menit să micșoreze tendința de autooxidare; reacția de reducere a legăturilor iminice prin tratare cu  $\text{NaBH}_4$  este necesară în majoritatea reactivilor dar poate lipsi în cazul utilizării N-hidroxisuccinimid esterilor precum DSS sau esterul (metil-PEG<sub>12</sub>)<sub>3</sub>-PEG<sub>4</sub>-NHS (derivat al PEG-ului) deoarece ei permit formarea unei legături amidice stabile între reactiv și aminele primare ( $\alpha$ -amina N-terminală sau  $\epsilon$ -amina din lizină) din proteină. Făcând excepție de acești pași, reacția de derivatizare poate fi descrisă astfel: soluția de Hb este amestecată cu reactivul de derivatizare și lăsată să reacționeze un anumit timp la rece după care are loc oprirea reacției cu borohidruură de sodiu în scopul reducerii legăturilor iminice la legături aminice, stabile dar și de a îndepărta excesul de grupări carbonilice. Produsul poliHb astfel obținut este dializat în soluție de Tris cu scopul de a îndepărta excesul de borohidruură și supus apoi unor etape de separare și analiză.

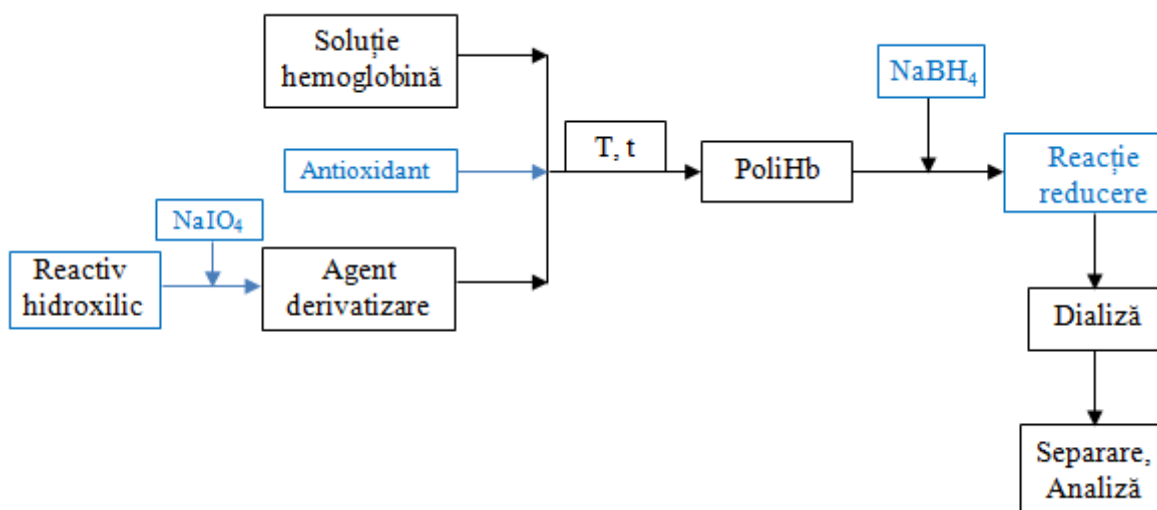
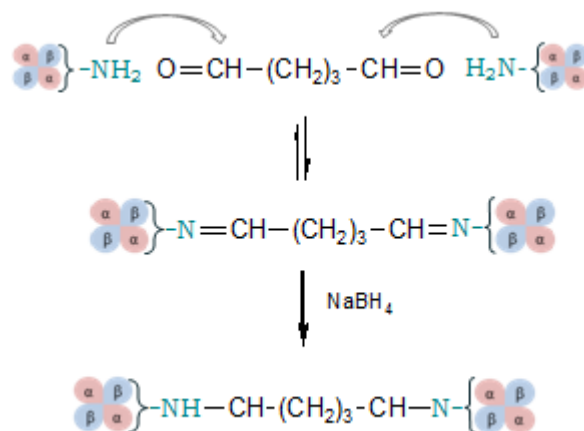


Figura 2.6. Etapele reacției de derivatizare a hemoglobinei

## Derivatizarea hemoglobinei cu reactivi dialdehidici

### Derivatizarea Hb cu glutaraldehydă

Din această categorie de reactivi s-a folosit glutaraldehyda (GL) deoarece este o dialdehydă cunoscută, bine definită și a mai fost utilizată în acest scop până în prezent, cu rezultate satisfăcătoare. Derivatizarea hemoglobinei cu glutaraldehydă permite formarea de legături intermoleculare care se realizează între grupările amino ale resturilor de lizină și valină și grupările carbonil ale glutaraldehydei implicând formarea iminelor; acestea sunt însă susceptibile la protonare și hidroliză; de aceea, pentru a evita regenerarea funcțiilor amino și carbonil, acestea se reduc cu hidrogenul provenit de la borohidruza de sodiu (Schema 2.1.).



Schema 2.1. Reacția hemoglobinei cu glutaraldehyda

S-au preparat probe derivatizate cu concentrații diferite de reactanți, s-au analizat prin intermediul electroforezei și a cromatografiei de excluziune sterică, stabilindu-se ulterior concentrațiile optime. Astfel, hemoglobina s-a utilizat în concentrație 1mM Hb iar glutaraldehyda 5mM GL. Produsului polimerizat i s-a măsurat afinitatea față de peroxid și ascorbat, comparând-o cu cea a Hb native; constantele Michaelis calculate dovedesc că produsul polimerizat are afinitate redusă față de peroxid dar crescută față de acidul ascorbic.

Produsului PoliHb obținut i s-a măsurat viteza de autooxidare cu scopul aflării cantității de metHb formată. În urma incubării la 37°C timp de 4 ore Hb nativă conținea 21,42% metHb iar cea derivatizată cu glutaraldehydă 29,24% metHb.

Toxicitatea probelor de hemoglobină – atât nativă cât și derivatizată cu glutaraldehidă – a fost testată pe culturi de celule umane și pe limfocite umane. Două din probele de hemoglobină derivatizată au conținut și amestec de antioxidanți: catalaza (1000U), acid ascorbic (100μM), acid uric (100μM), cisteină (10μM), BSA (100μM) sau doar catalaza (1000U) și acid ascorbic (100μM).

Testările pe culturi celulare s-au făcut pe linia celulară endotelială HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) la Institutul de Oncologie „I. Chiricuță”. S-a ales linia de celule HUVEC deoarece ele intră în compoziția vaselor sanguine și ar fi primele afectate de substanțele studiate, atunci când ele pătrund în circulația sanguină *in vivo*.

S-a utilizat testul de MTT de proliferare celulară. La baza metodei stă proprietatea mitocondriilor celulelor vii de a transforma colorantul MTT din forma tetrazoliu (galbenă) în MTT-formazan, de culoare violet. Numărul de celule vii se poate cuantifica pe baza cantității de formazan formate, deci pe baza intensității colorației, urmărită spectrofotometric (prin citirea absorbției la 492nm), ea fiind direct proporțională cu numărul de celule vii din cultura celulară. S-au efectuat trei teste pentru fiecare substanță în parte. După 24, 48, 72 h de incubare a plăcilor, a fost adăugată soluția MTT la o concentrație finală de 1 mg/mL/godeu și incubată din nou, la 37°C pentru încă 1 h. Apoi a fost adăugat DMSO în fiecare godeu pentru a dizolva formazanul și citită absorbția.

Rezultatele obținute în urma testului de celule HUVEC arată că atât Hb nativă cât și Hb derivatizată prezintă un efect ușor inhibitor asupra culturii de celule pe termen scurt (24 h) dar și pe termen mai lung (72 h). De remarcat este faptul că nici una din probele care conțin amestec de antioxidanți nu au un efect pozitiv în testul realizat.

Testul pe limfocite umane, arată că după 24 h probele de Hb nu inhibă în mod semnificativ creșterea celulelor. O ușoară inhibiție a creșterii limfocitelor se observă și după 48 h, iar după 72 h se poate distinge o diferență în comportamentul probelor de Hb nativă sau derivatizată și anume faptul că Hb derivatizată cu GL are un efect stimulator. Precum în cazul celulelor HUVEC, probele care conțin antioxidanți nu prezintă comportament îmbunătățit.

#### Copolimerizarea hemoglobinei cu glutaraldehidă

Datorită tendinței de autooxidare destul de ridicată pentru proba derivatizată cu glutaraldehidă, s-a încercat derivatizarea în prezența albuminei serice bovine, aceasta fiind introdusă în amestecul de reacție odată Hb și reactivul de derivatizare. Metoda s-a dovedit a fi eficientă în ceea ce privește tendința de autooxidare crescută: copolimerii obținuți au atât viteza de

autooxidare mai mică decât a poliHb (și în unele cazuri mai mică chiar decât a Hb native) dar și reactivitatea prooxidantă mai scăzută. De asemenea, radicalul liber obținut prin măsurători RES a probei derivatizate în reacție cu apa oxigenată, este mai puțin intens în cazul copolimerului. Pe baza acestor rezultate, considerăm albumina serică un ingredient necesar în prepararea unui substitut de sânge. Afinitatea față de oxigen nu este afectată de introducerea albuminei în amestecul de reacție, probele derivatizate având afinitate față de oxigen mai mare decât a Hb native, în ambele cazuri, iar coeficientul Hill calculat indică reducerea drastică a cooperativității.

Un alt copolimer, realizat de colaboratorii noștri are la bază rubreritrina, o proteină din clasa peroxidazelor cu fier non-heminic, întâlnită în organismele anaerobe. Caracteristica ce o diferențiază însă de peroxidazele clasice este că are capacitatea de a reduce apa oxigenată *evitând* formarea de oxidanți puternici precum Compusul I și/sau Compusul II sau radicali liberi. Mai mult, constanta  $K_m$  corespunzătoare afinității pentru apa oxigenată este cu două ordine de mărime mai mică în cazul rubreritrinei comparativ cu cea corespunzătoare pentru peroxidaze heminice sau catalaze. Aceste trăsături sunt avantaje pentru o enzimă cu rol antioxidant, protectiv, și o recomandă ca ingredient util în preparatele dorite a fi substituite de sânge.

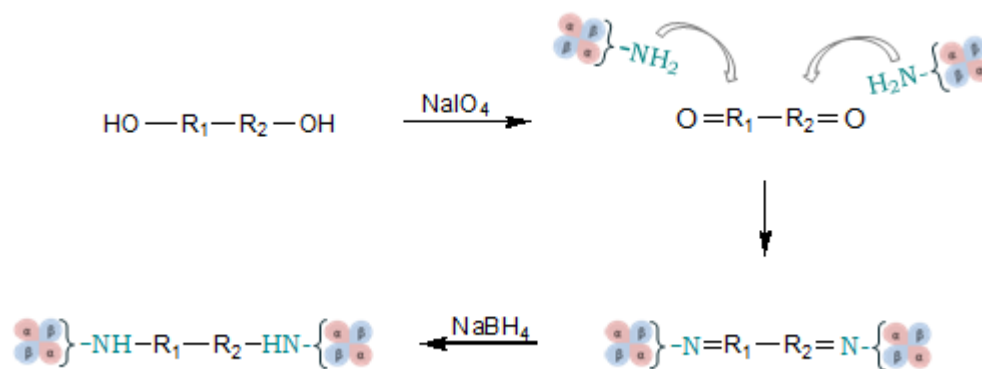
Astfel, experimente realizate de colaboratorii noștri au demonstrat că transportorul de oxigen uman (și nu numai) - Hb - poate fi copolimerizat cu Rbr (aceasta din urmă fiind introdusă în amestecul de reacție) folosind glutaraldehidă, rezultând produși cu masă moleculară mare care prezintă legătură covalentă Rbr-Hb; produșii au capacitate crescută/ridicată de descompunere a peroxidului oferind speranțe în obținerea unui substitut de sânge mai puțin toxic. De altfel, testele pe culturi de celule umane (HUVEC) au arătat un efect ușor stimulator pentru copolimerul cu rubreritrină la un interval de 24 h, acesta dispărând însă la timp mai îndelungat (48, respectiv 72 h).

#### Derivatizarea hemoglobinei cu reactivi dialdehidici generați prin oxidare cu periodat

Alți reactivi folosiți pentru formarea de legături covalente între moleculele de Hb au fost cei care conțin grupări -OH care trebuie oxidate în prealabil la grupări carbonilice, oxidare care se face cu periodat de sodiu ( $\text{NaIO}_4$ ). Apoi, ei pot reacționa cu hemoglobina la oricare dintre grupările amino primare rezultând astfel legături intra și intermoleculare. Reactivii folosiți, din această categorie, sunt: adenzin trifosfat (ATP), polietilenglicol (PEG), amidon, alginat de sodiu.

Schema de mai jos redă etapele reacției de derivatizare cu un astfel de reactiv ale cărui grupări carbonilice au fost generate prin oxidare cu  $\text{NaIO}_4$ . Pentru simplitate reactivul a fost notat OH-R<sub>1</sub>-R<sub>2</sub>-OH.





Schema 2.2. Etapele reacției de derivatizare a hemoglobinei cu reactivi dialdehidici, generați prin oxidare cu periodat de sodiu

Astfel, s-a obținut Hb derivatizată cu formele oxidate ale ATP-ului, amidonului, PEG-ului și alginatului; produșii au fost caracterizați în contextul autooxidării, reactivității față de peroxid, afinității față de oxigen și a toxicității. Chiar dacă tendința de autooxidare a fost mai mare decât a Hb native pentru toți cei trei polimeri (în special pentru cel obținut cu polietilenglicol), testele pe culturi de celule HUVEC arată toxicitate redusă, neglijabilă. Cantitatea de feril, Fe(IV), formată în urma reacției cu peroxidul este aproximativ egală cu cea formată în cazul Hb native pe când stabilitatea ei este mai mică. Un alt dezavantaj al probei derivatizate cu polietilenglicol este activitatea enzimatică scăzută: cu 33% mai mică decât a Hb native. Spectrele RES înregistrate arată că intensitatea radicalului liber este mai mare în cazul probelor derivatizate decât în cazul Hb native (în cazul unora dintre ele chiar de 10 ori mai mare), iar dintre acestea, Hb derivatizată cu glutaraldehidă (ea fiind folosită drept model) prezintă semnalul cel mai mare, fiind urmată de Hb-PEG iar cea derivatizată cu oATP prezintă intensitatea cea mai mică. O analiză mai amănunțită a acestor semnale, neprezentată în lucrarea de față, sugerează, printre altele, că adenina din structura ATP-ului nu este un centru stabil de absorbție a radicalilor liberi, precum Tyr din Hb; în fapt, forma semnalelor de radical liber din hemoglobinele derivatizate este, invariabil, aceeași cu cea din hemoglobina nativă, sugerând că locația radicalului liber nu a fost afectată semnificativ de oricare din procedeele de derivatizare/polimerizare.

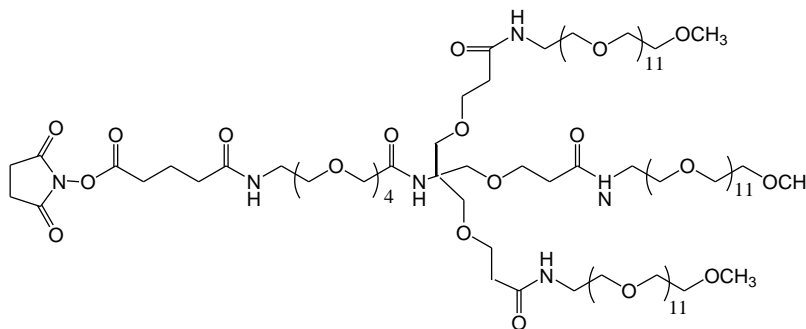
În vederea reducerii tendinței de autooxidare și a reactivității față de peroxid, în amestecul de reacție s-au introdus diferiți antioxidanți precum: ascorbat, BSA, tiosulfat, glucoza. Astfel, probele derivatizate doar cu oATP prezintă o viteză mai mare de autooxidare, derivatizarea în prezența

antioxidanților în schimb, rezolvă această problemă. Mai mult, probele în care s-a adăugat BSA au tendința de autooxidare a polimerului mai mică chiar decât a Hb native, în timp ce polimerizarea doar cu oATP are efect opus iar afinitatea pentru oxigen și coeficientul Hill au valori similare cu cele ale Hb native. Aceste caracteristici prezintă un avantaj, atât timp cât derivatizarea chimică conduce la scăderea vitezei de autooxidare, creșterea afinității pentru oxigen și micșorarea cooperativității. De asemenea, prezența albuminei, conduce la un radical liber de o intensitate observabil mai mică - lucru benefic pentru un substitut de sânge.

### Derivatizarea hemoglobinei într-un singur pas

Derivatizarea Hb într-un singur pas s-a realizat folosind doi reactivi din categoria NHS-esterilor: esterul (metil-PEG<sub>12</sub>)<sub>3</sub>-PEG<sub>4</sub>-NHS și disuccinimidul suberat. Ambele reacții decurg cu formarea unei legături amidice stabile între reactiv și aminele primare ( $\alpha$ -amina N-terminală sau  $\epsilon$ -amina din lizină), deci cu formarea unei legături peptidice directe.

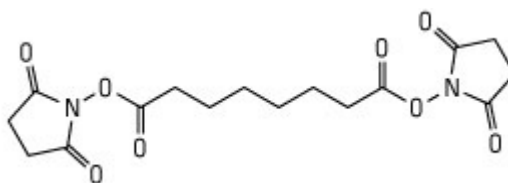
Primul din cei doi reactivi conține o ramură cu patru unități de etilenglicol, la unul dintre capete aflându-se esterul N-hidroxisuccinimidic iar la celălalt capăt trei ramuri PEG cu câte 12 unități de etilenglicol, de fiecare fiind atașate câte o grupare metil (Schema 2.3.).



Schema 2.3. (metil-PEG<sub>12</sub>)<sub>3</sub>-PEG<sub>4</sub>-HNS

Rezultate remarcabile s-au obținut în cazul produsului Hb-PEG: cantitatea de metHb formată în timpul derivatizării este nesemnificativă - valori apropiate de cele obținute pentru Hb nativă, dar cel mai important aspect este faptul că prezintă o afinitate pentru oxigen mai mică față de cea a Hb native și prezintă cooperativitate, lucru neîntâlnit la Hb derivatizate prin celelalte metode prezentate în această lucrare; în plus, testele pe culturi de celule HUVEC nu arată toxicitate pentru acest polimer.

DSS este un agent de reticulare homobifuncțional ce conține în molecula sa un braț cu opt atomi de carbon la fiecare capăt fiind atașată gruparea esterică, care reacționează cu resturile de lizină formând legături peptidice directe (Schema 2.4.)



Schema 2.4. Disuccinimidil suberat

Produsul obținut prin folosirea reactivului DSS se reamarcă prin tendința scăzută de autooxidare comparativ cu Hb nativă și prin intensitatea mică a radicalului liber (mai mică decât în cazul Hb native) – lucru benefic pentru un substitut de sânge.

### **Derivatizarea unor alternative la Hb bovină**

Au fost purificate și analizate Hb din mai multe surse cu scopul de a indentifica globine în care tendința de autooxidare, reactivitatea față de peroxid și/sau cea de eliberare a oxigenului, atât în cazul Hb native cât și în cazul celei derivatizate (cu glutaraldehidă) sunt diferite de celelalte studiate și prezentate anterior. Diferențele ar putea fi avantaje sau dezavantaje în folosirea lor pentru prepararea substitutelor de sânge.

Similar Hb bovine, valorile  $K_m$  pentru ascorbat obținute sunt mici și cuprinse în intervalul 20-30 $\mu$ M; nu se observă diferențe semnificative de aceea ele sunt neglijabile. Cele corespunzătoare pentru peroxid sunt cuprinse între 400-4000 $\mu$ M, în acord cu parametrii corespunzători ai peroxidazelor *bona fide*, Hb bovină și cea de șobolan prezentând cea mai mică valoare  $K_m$  pentru peroxid – de aprox. cinci ori mai mică decât cea a Hb de câine. Pe baza acestui rezultat, care indică o afinitate mare față de peroxid a Hb bovine, putem afirma că aceasta ar fi mai puțin recomandată ca și material pentru substitut de sânge, comparativ cu Hb de câine. În ceea ce privește valorile  $k_{cat}$ , Hb ovină și cea de șobolan par să fie cele mai puțin reactive față de peroxid. Astfel, datele prezentate sugerează că Hb canină și ovină prezintă avantaj față de cea bovină în măsura în care manifestă o reactivitate prooxidantă scăzută.

Dintre formele poli- și copolimerizate s-au remarcat poliHb bovină, canină și de șobolan ca fiind cele mai rezistente față de atacul apei oxigenate, Hb ovină (nativă și copoli) având constantele de viteză (de eliberare a oxigenului de pe oxiHb) cele mai mari și copolimerii de Hb bovină și

caprină ca având cea mai mică tendință de autooxidare. Copolimerii acestor proteine cu BSA, în special ai celei ovine și de șobolan, ar putea constitui candidați superiori de substitute de sânge rezistente la stresul oxidativ;

### **Interacțiunea transportorilor de oxigen pe bază de hemoglobină cu monoxidul de azot (NO), respectiv cu azotitul (NO<sub>2</sub>)**

A fost monitorizată reacția oxiHb – nativă și derivatizată cu monoxidul de azot, respectiv azotit, ambele având ca produși finali metHb și azotatul de sodiu.

În primul caz, au fost studiate constantele de viteză, fiind de dorit valori cât mai mici. Constantele obținute însă, nu diferă semnificativ între Hb nativă și diferitele forme derivatizate ale acesteia, în reacție cu NO.

În al doilea caz, deși se cunosc produșii finali, mecanismul reacției nu este pe deplin elucidat. Conform ultimelor abordări, mecanismul de reacție se poate împărți pe două etape: etapa de inițiere și etapa de propagare autocatalitic.

Reacția dintre azotit și forma oxi a Hb este influențată de forma acestui din urmă reactant, cea derivatizată conducând la încetinirea formării formei ferice. De asemenea, s-a studiat influența unor antioxidanți (acidul uric, acidul ascorbic, acidul cafeic, N-acetil L-cisteina, albumina serică bovină) asupra acestei reacții, cu scopul de a reduce viteza de oxidare a Hb în prezența azotitului de sodiu. Rezultatul a fost cel dorit: s-au dovedit a fi eficienți în reducerea vitezei de reacție. Deși prezența albuminei serice în copolimer are un efect redus asupra reacției, adăugarea ei în stare liberă, dar și a celorlalți antioxidanți, pare a împiedica procesul de oxidare. Aceste rezultate încurajează ipoteza conform căreia radicalii liberi se acumulează în faza inițială a reacției. Se crede că motivul pentru care viteza de autooxidare este mai mică în reacțiile în care sunt implicate formele polimerizate ale Hb este acela că derivatizarea reduce accesul anionilor exogeni și a radicalilor liberi la atomul de fier.

## **Stabilitatea transportorilor de oxigen pe bază de hemoglobină la agenți denaturanți**

S-au studiat stabilitatea substitutelor de sânge în funcție de doi factori și anume: căldura - care afectează legăturile de hidrogen și o soluție denaturantă (guanidina) care distruge interacțiunile hidrofobice.

Denaturarea, forțată aici de folosirea unei temperaturi mai mari decât cele 37°C relevante fiziologic și folosite în capitolele anterioare pentru măsurarea vitezelor de autooxidare, s-a realizat la 60°C și poate furniza indicii în privința stabilității proteinei din punct de vedere strict mecanic. Pentru a studia comparativ comportamentul Hb derivatizate s-a studiat timpul în care acestea se autooxidează la temperatura dată și s-a urmărit evoluția absorbanțelor la lungimile de undă unde tranziția dintre formele oxo și met prezintă puncte izosbestice. Orice modificare survenită în această regiune indică un proces de denaturare a proteinei, sau de intervenție a unei a treia stări în procesul de autooxidare – niciuna dintre opțiuni nefiind de dorit. Astfel, comparativ cu Hb nativă stabilitatea cea mai mare la această temperatură copolimerul Hb-BSA.

O abordare paralelă se poate face folosind ca agent denaturant guanidina în care se compară Hb nativă cu cea polimerizată cu glutaraldehidă. Se remarcă o stabilitate net superioară a hemoglobinei derivatizate – în condițiile în care testele efectuate la 60°C folosind temperatura ca agent denaturant au relevat o tendință opusă; acestea din urmă pot fi considerate a fi mai relevante fiziologic.

## **Substitute de sânge pe bază de hemeritrină**

Substitutele de sânge pe bază de hemeritrină conțin ca ingredient activ hemeritrina – transportorul de oxigen din majoritatea nevertebratelor marine; hemeritrina realizează transportul oxigenului molecular prin intermediul unui centru bimetalic, Fe(II)-Fe(II) și prezintă avantaje precum reactivitate redusă față de apa oxigenată, monoxidul de azot și nitrit. Un alt avantaj este masa moleculară mult mai mare decât a Hb: 108kDa vs 64kDa, ceea ce ar trebui să ducă la scăderea nivelului de extravazare și eliminare prin rinichi. Până în prezent, la nivel de laborator - în cadrul grupului nostru de cercetare - s-a obținut cu succes hemeritrină polimerizată cu glutaraldehidă și pegalată. Efectele acestor produși asupra procedurii de obținere a unei mase moleculare

satisfăcătoare, tendinței de autooxidare și afinității pentru oxigen par a fi favorabile pentru a le utiliza în sintetizarea unui substitut de sânge.

Toxicitatea probelor de hemeritrină – atât nativă cât și derivată – a fost testată pe culturi de celule umane și pe limfocite umane. Mai mult, s-a făcut comparația între toxicitatea acestora și a celor pe bază de Hb. Astfel, hemeritrina (nativă sau derivată) manifestă un efect stimulator asupra celulelor umane (HUVEC), în timp ce Hb are un efect ușor inhibitor; un efect similar, pozitiv, îl manifestă și asupra limfocitelor umane însă doar produsul derivatizat cu GL. Per ansamblu, putem concluziona că hemeritrina și produșii derivați pe bază de hemeritrină au toxicitate redusă comparativ cu Hb și derivații săi.

Pentru a studia și mai eficient toxicitatea acestor două proteine transportoare de oxigen s-a testat efectul acestora pe șoareci. Ei au fost împărțiți în trei părți egale cărora li s-a injectat soluții de methemeritrină, respectiv oxihemoglobină în cantități și concentrații egale, iar a treia parte, netratată, a reprezentat referința. După 10 minute, din fiecare s-a luat aceeași cantitate de sânge și au fost măsurate spectrele RES; semnalul de radical liber cel mai intens îl prezintă proba căreia i s-a administrat intravenos hemoglobină liberă. În acest context hemeritrina pare să nu elicite stres oxidativ *in vivo* la nivelul pe care îl elicita hemoglobina – ceea ce reprezintă un element promițător pentru polimerii de hemeritrină ce urmează a fi testați în condiții similare. Singura piedică întrevăzută pe această direcție de cercetare este posibila antigenicitate a hemeritrinei; acest aspect este adresat prin derivatizarea cu glutaraldehidă, care blochează resturile de lizină de la suprafața Hr pe lângă faptul că induce polimerizarea ei, și polietilenglicolul, care se atașează de asemenea la suprafața proteinei.

## Lista publicațiilor pe tema de doctorat

### Publicații ISI:

1. Bianca Iacob, Florina Deac, Daniela Cioloboc, Grigore Damian, Radu Silaghi-Dumitrescu, „Hemoglobin-albumin crosslinked copolymers: reduced prooxidant reactivity”, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology*, **2011**, 39, 293-297
2. Eva Fischer-Fodor, Augustin Mot, Florina Deac, Mariann Árkosi, Radu Silaghi-Dumitrescu, „Toward hemerythrin-based blood substitutes: comparative performance to hemoglobin on human leukocytes and umbilical vein endothelial cells”, *Journal of Biosciences*, **2011**, 36, 215-221
3. Florina Deac, Bianca Iacob, Eva Fischer-Fodor, Grigore Damian, Radu Silaghi-Dumitrescu, „Derivatization with periodate-generated reticulation agents: evaluation of oxidative reactivity for potential blood substitutes”, *Journal of Biochemistry*, **2011**, 149, 75-82
4. Oana Zolog, Augustin Mot, Florina Deac, Alina Roman, Eva Fischer-Fodor, Radu Silaghi-Dumitrescu, „A new polyethyleneglycol-derivatized hemoglobin derivative with decreased oxygen affinity and limited toxicity”, *The Protein Journal*, **2011**, 30, 27-31

### Publicații BDI:

5. Violeta-Florina Deac, Anamaria Todea, Radu Silaghi-Dumitrescu, „Glutaraldehyde derivatization of hemoglobin: a potential blood substitute”, *Metal Elements in Environment, Medicine and Biology Tome IX*, Radu Silaghi-Dumitrescu, Gabriela Garban, Eds., **2009**, Cluj University Press, Cluj-Napoca, Romania, pp 165-173
6. Mariann-Kinga Árkosi, Florina Deac, Radu Silaghi-Dumitrescu, „Hemoglobin peroxidase activity: interaction with hydroquinone and anthracene”, *Metal Elements in Environment, Medicine and Biology Tome IX*, Radu Silaghi-Dumitrescu, Gabriela Garban, Eds., **2009**, Cluj University Press, Cluj-Napoca, Romania, pp 99-110
7. Violeta-Florina Deac, Anamaria Todea, Ana Maria Bolfa, Paula Podea, Petronela Petrar, Radu Silaghi-Dumitrescu, „Ascorbate binding to globins”, *Romanian Journal of Biochemistry*, **2009**, 46, 115-121

8. Violeta-Florina Deac, Ana Maria Bolfa, Cristian Magdas, Bogdan Sevestre, Silvia Turc, Radu Silaghi-Dumitrescu, „Hemoglobin-based blood substitutes: wich hemoglobin to use?”, *Romanian Journal of Biochemistry*, **2010**, 47, 135-141
9. Florina Deac, Nicoleta Cotolan, Zoltan Kis, Radu Silaghi-Dumitrescu, „A dithionite-induced six-coordinated species at the heme in deoxy hemoglobin”, *Metal Elements in Environment, medicine and Biology Tome X*, Radu Silaghi-Dumitrescu, Gabriela Garban, Eds., **2010**, Eurobit Publishing House, pp 121-126

*Trimise spre publicare:*

1. Veronica Pop, Violeta-Florina Scurtu, Sonia Mahut, Ionel Haiduc, Radu Silaghi-Dumitrescu, ”The antioxidant-modulated effect of nitrite on the oxy forms of hemoglobin polymers”, 2012 *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Ser. Chemia*, **2012**
2. Florina Scurtu, Oana Zolog, Bianca Iacob, Radu Silaghi-Dumitrescu, ”Hemoglobin-albumin crosslinking with disuccinimidyl suberate (DSS) and/or glutaraldehyde for blood substitutes”, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology*, **2012**

*În curs de trimitere :*

1. Radu Silaghi-Dumitrescu, Dimitri A. Svistunenko, Daniela Cioloboc, Florina Scurtu, Chris E. Cooper, ”Nitrite binding to globins: linkage isomerism, EPR silence and reductive chemistry”. *Redox Biology*, **2012**