

Roman Gondko, Maria Adamska

HEMOGLOBINY TKANKOWE BEZKRĘGOWCÓW

U bezkręgowców rolę transportera tlenu pełnią różne białka. Są one rozpuszczone w płynach układu krążenia lub zawarte w jego komórkach. Białka te (hemoglobiny) występują także w innych tkankach, stąd ich ogólna wyróżniająca nazwa - hemoglobiny tkankowe.

Barwniki te pełnią ważną rolę, o czym świadczy chociażby fakt ich występowania w tkankach zwierząt, których krew czy hemolimfa nie zawiera białek oddechowych.

W pracy przedstawiono występowanie hemoglobin w świecie zwierząt, ich właściwości fizykochemiczne z uwzględnieniem powinowactwa tlenowego.

WSTĘP

Pojawienie się na Ziemi metabolizmu tlenowego było jednym z kluczowych etapów ewolucji biologicznej. Przetworzenie pierwotnej przemiany beztlenowej na szlak aerobowy przyniosło organizmowi ogromny zysk energetyczny. W trakcie przemiany tlenowej zredukowanego związku, jakim jest glukoza, organizm zyskuje aż 36 cząsteczek ATP. Tymczasem z tej samej glukozy w pierwotnym procesie fermentacji otrzymać można tylko 2 cząsteczki ATP [41]. Ten prawie 20-krotny przyrost energii był zabezpieczeniem dla dalszego wzrostu poziomu organizacyjnego materii i informacji. Skokowy wzrost stopnia organizacji materii i informacji wymagał w procesie ewolucji określonego wydatku energetycznego. Współzależność tych trzech wspomnianych czynników zapewniła w trakcie ewo-

lucji ciągły strumień materii, energii i informacji, krótko mówiąc - życie.

Fakt ten, będący istotnym skokiem ewolucyjnym, mógł mieć dopiero wówczas miejsce w czasie, kiedy to stężenie tlenu w atmosferze ziemskiej ustaliło się na stałym poziomie. Pierwotnie, obecny w atmosferze tlen spełniał dla życia ochronną rolę przed niszczącym go działaniem promieniowania ultrafioletowego. Przy tym zawartość tlenu w powietrzu w tym czasie musiała być na dużo niższym poziomie. Ocenia się, iż początkowa zawartość tlenu w atmosferze wynosiła zaledwie 0,001 obecnej jego ilości [24].

Dostarczenie większym organizmom tlenu tylko drogą dyfuzji, ze względu na powolne jej tempo, okazuje się niewystarczające. Tak więc prosta dyfuzja limituje rozmiar organizmów do wielkości ok. 1 mm [45].

Dla zapewnienia określonego zapotrzebowania w tlen rozwinęły się dwa mechanizmy gwarantujące tkankom ciągłą dostawę tego gazu. Pierwszy, przeciwstawny dyfuzji, to układ krążenia (naczyniowy). Drugim nie mniej ważnym mechanizmem adaptacyjnym było pojawienie się białek oddechowych. Za ich pomocą ominięte zostało istotne fizyczne ograniczenie, jakim jest niska rozpuszczalność tlenu w wodzie. W zależności od temperatury i zasolenia w litrze wody znajduje się ok. 5 ml tlenu (15 mg/l). Tymczasem liter krwi ludzkiej niesie 250 ml tlenu. Ta 50-krotna korzystna różnica ma swoje podłoże molekularne. Zwiększoną rozpuszczalność tlenu umożliwiają obecne w erytrocytach cząsteczki hemoglobiny [41].

Odkrycie barwników tkankowych to dalszy czynnik adaptacyjny, zabezpieczający na poziomie molekularnym organizmy (tkanki) w tlen. U wielu zwierząt obok barwników krwi (hemolimfy) występuje w niektórych organach (tkankach) uzupełniający barwnik oddechowy. Stąd też dla barwników tych zaproponowano ogólną nazwę: hemoglobiny tkankowe (HbT).

Wspomnieć należy o jeszcze jednym bardzo rzadkim sposobie pozyskiwania tlenu, jakim jest symbioza wewnątrzkomórkowa. Uwolniony podczas dnia w procesie fotosyntezy tlen zoochlorelle i zooxantelle oddają symbiotycznym komórkom zwierzęcym [22].

Podstawową funkcją białek oddechowych jest zabezpieczenie zwierząt areobowych w tlen tak niezbędny dla nich składnik życiowy, jakim jest tlen. Wspomniane białka są związkami nader różno-

rodnymi pod względem chemicznym i biologicznym. Ich wyróżniającą wspólną cechą ważną z biologicznego punktu widzenia jest zdolność do odwracalnego wiązania tlenu. Wszystkie białka oddechowe są metaloproteinami. Do białek tych należą: mioglobiny (Mb), hemoglobiny (Hb), erytrokruoryny (Er), chlorokruoryny (Chl), hemoerytryny (Hr) i hemocyjaniny (Hc). Żelazo w hemoerytrynach, a w hemocyjaninach miedź, połączone są bezpośrednio z białkiem. W pozostałych białkach oddechowych zdolność wiązania tlenu zapewnia obecność grupy prostetycznej - hemu. Przy tym przyłączeniu cząsteczki tlenu nie towarzyszy utlenienie metalu.

Wszystkie wymienione białka występują u bezkręgowców, a wśród nich najbardziej rozpowszechnionymi są hemoglobiny i hemocyjaniny. Natomiast u kręgowców spotykamy tylko mio- i hemoglobiny. We krwi lub hemolimfie hemoglobina występuje bądź w erytrocytach, bądź rozpuszczona jest w tkance. Tymczasem hemocyjaniny nigdy nie występują w komórkach, lecz zawsze rozpuszczone są w płynnej tkance.

Ze względu na swą istotną rolę białka oddechowe stanowią przedmiot szerokiego zainteresowania badaczy. Już w 1839 r. H u n e f e l d otrzymał jako pierwszy krystaliczny preparat hemoglobiny dżdżownicy [19]. W 1864 r. H o p p e - S e y l e r posłużył się terminem "hemoglobina" do określenia czerwonego barwnika krwi kręgowców [16]. Nazwę "erytrokruoryna" nadał w 1868 r. L a n c k e s t e r czerwonemu barwnikowi krwi bezkręgowców [25]. Ta ostatnia nazwa używana jest obecnie zwyczajowo dla podkreślenia pochodzenia białka. Poza bowiem masą cząsteczkową pomiędzy wymienionymi barwnikami brak istotnych różnic [6]. Podobnie, na tym samym kryterium (masy cząsteczkowej) oparto rozróżnienie mio- i hemoglobin.

Właściwości fizykochemiczne białek oddechowych znalazły się również w kręgu zainteresowań polskich badaczy. W 1853 r. T e i c h m a n n jako pierwszy otrzymał w Krakowie kryształy chlorodorku heminy [44]. Prace M a r c h l e w s k i e g o i N e n c k i e g o nad hemoglobiną i chlorofilem, ustalające pokrewieństwo tych barwników, stanowią trwały wkład do nauki [44].

Badania nad białkami oddechowymi w ośrodku łódzkim zapoczątkowane przez Dmochowskiego są nadal kontynuowane. W 1924 r. D m o c h o w s k i doniósł o wykryciu w osadach hematyny tra-

wiennej niezidentyfikowanych związków azotowych [5]. Następnie w preparatach hemoglobin różnego pochodzenia L e y k o wykryła nukleotydy adeninowe i adeninę [27, 29]. Także w preparatach mioglobiny wołowej stwierdzono obecność związków adeninowych [11]. W i e r z b i c k i w 1974 r. doniósł o wykryciu w erytrocytach ptasich hemoglobiny jądrowej [47]. Badania nad białkami oddechowymi zostały ostatnio poszerzone o hemocyjaniny [1, 13]. Rozumiane szeroko właściwości fizykochemiczne białek oddechowych stanowią przedmiot badań w ramach problemu resortowego [43].

WYSTĘPOWANIE. OGÓLNE WŁAŚCIWOŚCI

Wspomniano powyżej, że u wielu zwierząt obok barwnika oddechowego krwi, hemolimfy czy płynu celomy obecny jest w niektórych tkankach dodatkowy barwnik. W większości przypadków występuje on w mięśniach, nadając im charakterystyczną brązową lub czerwoną barwę. Fizjologicznie rola barwnika tkankowego wydaje się być ważną, o czym świadczy chociażby fakt obecności w tkankach zwierząt, których krew (hemolimfa) nie zawiera białek oddechowych. Klasycznym tego przykładem jest pierścienica *Aphrodite acuelata*, której krew i płyn ciała są bezbarwne, a mięśnie gładkie i ganglia mają kolor czerwony. Podobnie wielu przedstawicieli małży ma bezbarwną hemolimfę, a w ich mięśniu sercowym czy syfonach spotykamy hemoglobinę.

U kręgowców tylko ryby antarktyczne z rodziny *Chaenichthyidae* posiadają bezbarwną krew, lecz mają hemoglobinę w bulbus arteriosus i w mięśniach nasadowych płetw [2].

Hemoglobiny tkankowe (HbT) szerzej są rozpowszechnione u bezkręgowców. U kręgowców ograniczone do tkanki mięśniowej występowanie narzuca ich nazwę - mioglobin. Przy tym mioglobiny kręgowców są monomerami o masie ok. 17 000.

Uwzględniając stanowisko systematyczne zwierząt po raz pierwszy spotykamy hemoglobiny tkankowe u robaków (tab. 1). Wśród płazińców HbT występuje głównie u przedstawicieli przywr i wirków. Pośród robaków obłych barwnik tkankowy wykryto u nicieni zarówno u pasożytów, jak i form wolnożyjących. Wśród pierścienic białko to obecne jest u wieloszczetów i szczetnic. U robaków HbT wy-

T a b e l a 1

Występowanie hemoglobiny tkankowej u niektórych bezkręgowców

Typ:	Plathelminthes (Płazińce)	
Gromada:	Trematoda (Przywry)	
	Allasostoma magnum (M)	Gastrothylax crumenifer (M)
	Cotylophoron indicum (M)	Paramphistomum cervi (M)
	Dicrocoelium lanceolatum (M)	Proctoeces subtenuis (M)
	Fasciola gigantica (M)	Telorchis robustus (M)
	Fasciola hepatica (M m)	
Gromada:	Turbellaria (Wirki)	
	Phaenocora typhlops (Mz) GM	
	Phaenocora inopunctata (Mz; GM)	
Typ:	Nemathelminthes (Robaki obłe)	
Gromada:	Nematoda (Nicienie)	
	Ascaris lumbricoides (M; H; N)	Nematodirus filicollis (M)
	Camallanus trispinosus (M)	Nematodirus spathiger (M)
	Cooperia curticei (M)	Nippostrongylus brasiliensis (M; K)
	Diectophyne rentale (K)	
	Enoplus brevis (GM; H; AK)	Nippostrongylus muris (M)
	Enoplus communis (GM; H; AK)	Ostertagia circumcincta (M)
	Haemonchus contortus (M)	Parascaris equorum (M)
	Heterakis gallinae (M)	Strongylacantha glycirrhiza (M)
	Mermis sp. (M)	Tetrameres confusa (o) (M)
Typ:	Nemertini (Wstężniaki)	
	Amphiporus sp. (N)	Lineus ruber (N; SK)
	Borlasia olivacea (N)	Lineus viridis (N; SK)
	Cerebratulus ehrenbergii (N)	Meckelia somatotomus (N)
	Cerebratulus marginatus (N)	Meckelia chrenbergii (N)
	Lineus geniculatus (N)	Polia geniculata (N)
	Lineus gesserensis (N)	
	Lineus lacteus (N; SK)	
Typ:	Annelida (Pierścienice)	
Gromada:	Polychaeta (Wieloszczety)	
	Aphrodite aculeata (GM; N)	

Tabela 1 (cd.)

	<i>Arenicola marina</i> (M)
	<i>Glycera dibranchiata</i> (M; N)
	<i>Halosydna brevisetosa</i> (N)
	<i>Potamilla reniformis</i> (M)
	<i>Travisia pupa</i> (M)
Gromada:	<i>Echiuroidea</i> (Szczetnice)
	<i>Archynchite pugettensis</i> (M)
	<i>Thalassema</i> sp. (M; N; Mż)
	<i>Urechis caupo</i> (M)

U w a g a: M - mięśnie ścian ciała; Mg - mięśnie okolic głowy; Mż - mięśnie żołądka; GM - mięśnie gładkie; N - tkanka nerwowa; K - kutikula; H - hipoderma; SK - ściany naczyń krwionośnych; AK - mięśnie aparatu kopulacyjnego

stępuje w mięśniach, kutikuli, hipodermie. Mioglobiny brak jest w mięśniach pasożytujących nicieni. Natomiast u wolnożyjących nicieni i niektórych pierścienic w hemoglobinę bogate są mięśnie gładkie, jelita, czasami ryjek. Niektóre wstęźnice i pierścienice mają hemoglobinę w gangliach, rdzeniu nerwowym, a także w mięśniach otaczających rdzeń.

Hemoglobinę spotykamy również w mięśniach macicy niektórych przywr, jak *Fasciola hepatica* nie mającej układu oddechowego i krwionośnego, w mięśniach aparatu kopulacyjnego niektórych nicieni (*Enoplus* sp.) i w woreczku odbytowym. Przy nazwach poszczególnych zwierząt zamieszczonych w tab. 1 w nawiasach podano miejsce występowania barwnika.

Hemoglobiny tkankowe rozpowszechnione są wśród mięczaków, a głównie ślimaków (*Gastropoda*). Występują też u chitonów (*Loricata*), walconogów (*Scaphopoda*) i małży (*Bivalvia*) (tab. 2).

U *Aplacophora* (bruzdobrzuchy), *Monoplacophora* (jednopłytkowce) i *Cephalopoda* (głownogi) barwnik tkankowy dotychczas nie został wykryty. U przedstawicieli *Gastropoda*, *Loricata* i *Scaphopoda* barwnik ten występuje głównie w raduli. Oprócz tego u ślimaków spotykamy go w mięśniach żołądka, tkance nerwowej, rzadziej w mięśniu sercowym i nefridiach.

T a b e l a 2

Przykłady występowania hemoglobiny tkankowej wśród mięczaków
(brzuchonogi, małże, walconogi, chitony)

Gatunek	Wystę- powanie HbT	Gatunek	Wystę- powanie HbT
1	2	3	4
Podgromada: Prosobranchia			
<i>Acmaea cassis</i>	Mc	<i>Littorina scutulata</i>	Mc
<i>Acmaea digitalis</i>	Mc	<i>Livona pica</i>	Mc
<i>Acmaea scabra</i>	Mc	<i>Lottia gigantea</i>	Mc
<i>Acmaea testudinalis</i>	Mc	<i>Lunatia sp.</i>	R
<i>Aporrhais sp.</i>	P	<i>Macron lividis</i>	Mc
<i>Astraea caelata</i>	Mc	<i>Monodonta articulata</i>	R
<i>Astraea rugosa</i>	R	<i>Monodonta turbinata</i>	R
<i>Astraea tecta</i>	Mc	<i>Murex brevifrons</i>	Mc
<i>Astraea tuber</i>	Mc	<i>Murex trunculus</i>	Mc
<i>Buccinum sp.</i>	P, N	<i>Nassa sp.</i>	P
<i>Buccinum undatum</i>	R	<i>Natica sp.</i>	P
<i>Busycon canaliculatum</i>	R, O	<i>Nerita peloronta</i>	R
<i>Busycon contrarium</i>	R, S	<i>Nerita tessellata</i>	Mc
<i>Cerithium rupestre</i>	R	<i>Patella coeruela</i>	Mc
<i>Cerithium vulgatum</i>	R	<i>Patella lusitanica</i>	Mc
<i>Charonia variegata</i>	R	<i>Pila virens</i>	R, Mż, NF
<i>Columbella rustica</i>	R	<i>Pisania maculosa</i>	R
<i>Conus mediterraneus</i>	R	<i>Purpura sp.</i>	P
<i>Fasciolaria tulipa</i>	Mc	<i>Strombus costatus</i>	Mc
<i>Fusitriton oregonensis</i>	R	<i>Strombus gigas</i>	Mc
<i>Gibbula divaricata</i>	P	<i>Tegula finebralis</i>	Mc
<i>Gibbula guttadauri</i>	P	<i>Thais lamellosa</i>	R
<i>Haliotis fulgens</i>	Mc	<i>Tonna galea</i>	R
<i>Haliotis lamellosa</i>	Mc	<i>Tritonalia sp.</i>	P
<i>Haliotis ramtschatkana</i>	R	<i>Vermetus sp.</i>	P
<i>Hydrobia sp.</i>	R, P	<i>Viviparus sp.</i>	P
<i>Littorina angulifora</i>	Mc	<i>Urosalpinx cinerea</i>	Mc
<i>Littorina littorea</i>	P		
<i>Littorina neritoides</i>	R		
<i>Littorina planaxis</i>	Mc		

Tabela 2 (cd.)

1	2	3	4
Podgromada: Opisthobranchia			
<i>Aplysia californicus</i>	Mc, Mż, N	<i>Aplysia vaccaria</i>	N
<i>Aplysia depilans</i>	Mc, Mż, N	<i>Bulla gouldiana</i>	Mc, Mż
<i>Aplysia limacina</i>	Mc, Mż	<i>Bursatella</i> sp.	P, Mż
<i>Aplysia protea</i>	Mc	<i>Haminea virescens</i>	Mc
<i>Aplysia punctata</i>	N	<i>Tethys californicus</i>	Mc, Mż
Podgromada: Pulmonata			
<i>Ancylus</i> sp.	R, P	<i>Physa fontinalis</i>	P
<i>Helix</i> sp.	P	<i>Planorbis contortus</i>	Mż, P, N
<i>Limnaea auricularia</i>	R, P, Mż, N	<i>Planorbis corneus</i>	Mż, P, N
<i>Limnaea limora</i>	R, P, Mż, N	<i>Planorbis vortex</i>	Mż, P, N
<i>Limnaea palustris</i>	R, P, Mż, N	<i>Siphonaria gigas</i>	P
<i>Limnaea stagnalis</i>	R		
Gromada: Loricata			
<i>Acanthopleura granulata</i>	P	<i>Ischnochiton conspicuus</i>	R
<i>Chiton squamosus</i>	Mc	<i>Cryptochiton stelleri</i>	R
<i>Ischnochiton limaciformis</i>	Mc	<i>Katherina tunicata</i>	R
Gromada: Scaphopoda			
<i>Dentalium</i> sp.	R		
Gromada: Bivalvia			
<i>Phacoides pectinatus</i>	K, Kt	<i>Spisula solidissima</i>	N
<i>Mercenaria mercenaria</i>	Ma, S	<i>Tellina tenuis</i>	N
<i>Mercenaria campechiensis</i>	Ma, S	<i>Bankia setacea</i>	Ma, S, St
<i>Saxidomus nuttalli</i>	Ma	<i>Bankia</i> sp.	Ma
<i>Tivela stultorum</i>	Ma, Kt, L, Mm	<i>Teredo</i> sp.	Ma

U w a g a: Mż - mięśnie żołądka; N - tkanka nerwowa; R - radula; Nf - nefridia; S - m. sercowy, L - noga; P - mięśnie przełyku; Kt - ktenidia; Mp - mięśnie płaszczu; Sp - syfon; Mm - macica; Mc - masa bukalna Ma - mięśnie zwieraczy; O - chrząstka odontoforowa

Nieco inną lokalizację hemoglobiny stwierdzono u małży. Białko to występuje w mięśniach zwieraczy (*musculi adductores*), rzadziej w sercu i tkance nerwowej. Sporadycznie w skrzelach i płaszczu. Należy zaznaczyć, że u małży, walconogów i jednonerwców we krwi bądź hemolimfie obecna jest hemoglobina, nigdy zaś hemocyjanina.

Mamy niewiele danych o występowaniu hemoglobiny tkankowej u przedstawicieli z typu *Arthropoda*. W gromadzie *Crustacea*, HbT stwierdzono w mięśniach anten i tkance nerwowej niektórych *Cladocera* i *Conchostraca*. W rzędzie wąsonogich (*Cirripedia*), HkT spotykamy w różowych mięśniach odnóży, w komórkach nerwowych w muskulaturze jelitowej, a czasami w mięśniach *vasa differentia* [14, 40].

Ze względu na tchawkodyszny sposób oddychania, białka oddechowe u owadów występują bardzo rzadko. Wykryto je u form dorosłych w tracheolach wodnych drapieżnych pluskwiaków (*Buenoa margaritacea*) [18] w narządzie genitalnym (*Macrocorixa geoffroye*) [7] w tkance nerwowej larw *Chironomus* [26]. Białko to występuje też w tzw. "czerwonym narządzie" larw gza końskiego *Gastrophilus intestinalis* [37], a także w późniejszym stadium gza *Oestrus* sp. [21].

Podobnie jak u kręgowców, hemoglobiny tkankowe u bezkręgowców zlokalizowane są głównie w najruchliwszych mięśniach. U robaków będą to mięśnie zabezpieczające typowe dla nich czynności ruchowe, tj. podnoszenie i zginanie ciała. Za pomocą mięśni gładkich uzbrojonych szczęk "morska mysz" - *Aphrodite acuelata* chwytą zdobycz. Zakopujące się szczenice, jak *Urechis campo*, dzięki skurczom mięśni gładkich przyczepiają się do podłoża, a przepychanie przez jelita piasku pozwala tym zwierzętom na zarycie się w dnie i wybudowanie nory.

Roślinożerny "zając morski" *Aplysia*, niektóre chitony, dendrytofagi jak *Strombus*, osiadły ślimak - *Vermelus*, drapieżny ślimak *Nassa* czy *Tethys*, "morski ząb" - *Dentalium*, drapieżne świdrowniki: (ostrzygowaty świder) *Urosalpinx*, drapieżny *Natica* oraz pokrewne im mięczaki mają w raduli mioglobinę.

Występowanie hemoglobiny w zwieraczach niektórych małży, żyjących w przybrzeżnych wodach, tłumaczy się wykonywaną przez te

mięśnie pracą polegającą na utrzymaniu w czasie przypływu zamkniętych muszli (*Mercenaria* sp., *Saxidomus nuttallii*).

U mięczaków - świdraków: *Teredo* i *Bankia* (świdrak okrętowy) mioglobina pojawia się w mięśniach zwieraczy, co prawdopodobnie tłumaczy się tym, że funkcją ich jest wprowadzenie szczątkowej muszli w ruch świdrowy [2].

U skorupiaków mioglobina występuje w mięśniach anten i odnóży wykonujących rytmiczne ruchy.

U bezkręgowców hemoglobina obecna jest nie tylko w aktywnych mięśniach motorycznych. Znajdujemy ją także w innych tkankach. Wykryto ją w skrzelach mięczaków i w trachealnych komórkach stawonogów. U małża *Phacoides pectinatus* żyjącego w mule na głębokości ok. 0,5 m barwnik obecny jest w ktenidiach [36]. Białko to spotykamy w tkance, która nawet w najmniejszym stopniu nie może być narażona na niedostatek tlenu, tj. w tkance nerwowej. Dlatego też u zwierząt żyjących w środowisku o ograniczonej ilości tlenu, hemoglobina pojawi się w tkance tej w pierwszej kolejności.

W morskich osadach dennych żyje wieloszczet *Glycera dibranchiata*, u którego hemoglobinę właśnie wykryto w gangliach [15].

T a b e l a 3

Obecność hemoglobiny w jajach bezkręgowców

Typ	Gromada	Gatunek
Nemathelminthes (Robaki obłe)	Nematoda	<i>Ascaris lumbricoides</i>
Annelida (Pierścienice)	Polychaeta	<i>Scoloplos armiger</i>
	Echiuroidea	<i>Thalassema lankesteri</i> <i>Thalassema neptunii</i>
	Crustacea	<i>Artemia salina</i> <i>Daphnia magna</i> <i>Daphnia obtusa</i> <i>Daphnia pulex</i>
Arthropoda (Stawonogi)	Insecta	<i>Pediculus humanus</i> <i>Rhodnius prolixus</i>

Wręcz unikalnym wydarzeniem w naturze jest obecność hemoglobiny w jajach bezkręgowców. Przypadków takich znamy niewiele wśród przedstawicieli 3 typów: robaków, pierścienic i stawonogów (tab. 3).

Wymienione gatunki żyją w środowisku o niskiej lub niedostatecznej zawartości tlenu. Również inne białko oddechowe - hemocyjaninę - zlokalizowano w jajach krabów: *Carcinus maenas*, *Erichia sinensis* (wełnistoszczypcowy) i *Portunus holzschuhi* [4].

Wśród kręgowców jako jedyny przypadek występowania hemoglobiny odnotowano w jajach żaby *Bufo vulgaris japonicus*.

Dane dotyczące zawartości hemoglobin tkankowych bezkręgowców nie są liczne w porównaniu z liczbą prac dotyczących kręgowców [46]. U wymienionego już wieloszczeta *Aphrodite aculeata* stężenie Hb wynosi 0,7 mmol/hem/kg tkanki nerwowej. W tej samej tkance znacznie mniejsze stężenie równe 0,1 mmol/hem/kg stwierdzono u brzuchonogich mięczaków: *Aplysia californica*, *A. vaccaria* i *A. aeoliana*. U Nemertini, *Lineus lacteus*, *L. ruber* i *L. viridis* ilość HbT wynosi 0,055 mg na 100 g wagi (tab. 4).

Tabela 4

Zawartość HbT i Hb u pasożytów oraz Mb u mięczaków

Gatunek	Stężenie Hb lub HbT w 100 g tkanki
<i>Cotylophoron indicum</i>	1,67 g HbT
<i>Fasciola gigantica</i>	1,08 g HbT
<i>Gastrothylax crumenifer</i>	2,66 g HbT
<i>Haemonchus contortus</i>	16 mg HbT
<i>Nematodirus</i> sp.	19 mg HbT
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	0,124 g HbT
<i>Tetrameres confusa</i>	3,75 mg Hb
<i>Toxocara canis</i>	0,135 g Hb
<i>Toxocara mystax</i>	0,10 g Hb
<i>Gastrophylus intestinalis</i>	0,42 g Hb
Loricata: <i>Cryptochiron stelleri</i>	1-2% Mb
Gastropoda: <i>Busycon canaliculatum</i>	3-4% Mb

Tabela 4 (cd.)

Gatunek	Stężenie Hb lub HbT w 100 g tkanki
<i>Busycon contarium</i>	2-3% Mb
<i>Aplysia depilans</i>	5-6% Mb
Bivalvia: <i>Teredo</i> sp.	2% Mb
<i>Bankia</i> sp.	2% Mb

W larwach *Chironomus* stężenie Hb i polimorfizm zmienia się w zależności od stadiów ich rozwoju, warunków środowiskowych, zmienności sezonowej wynosząc w przybliżeniu od 0,10-0,24 mg Hb/mg suchej masy larw. Uważa się też, że intensywność syntezy Hb jest odpowiedzią na niskie stężenie tlenu [35].

Do tej pory raczej nie określono u bezkręgowców ilości sumarycznej barwników krwi i barwników tkankowych oraz wzajemnych ich stosunków. Takie dane pozyskane dla kręgowców pozwalają zrozumieć adaptację tych zwierząt do warunków środowiska [20]. U foki, delfina bądź pingwina, w porównaniu ze zwierzętami domowymi, suma hemoprotein (krwi i mięśni) jest 2-4 razy wyższą. Przy tym udział mioglobiny w tej sumie w przypadku zwierząt nurkujących jest 2-10 krotnie wyższy (w %). Okazało się, iż u kręgowców ilość mioglobiny pozostaje w ścisłej zależności od warunków ich bytowania i jest wyrazem adaptacji do tychże warunków (np. długiego nurkowania bez dostępu powietrza). W mięśniach dzikich zwierząt stwierdzono większe ilości mioglobiny niż w mięśniach pokrewnych im zwierząt domowych. Przebywające w warunkach niskiego ciśnienia parcjalnego tlenu zwierzęta wysokogórskie charakteryzują się podwyższonym, w porównaniu ze zwierzętami nizinnymi, poziomem mioglobiny. Najwyższe zawartości mioglobiny wykryto w mięśniach ssaków nurkujących na duże głębokości.

W zależności od warunków ekologicznych (ilości tlenu), tak jak u kręgowców podobnie u bezkręgowców, należałoby również oczekiwać znacznej różnicy w zawartości mioglobiny. Zauważono w zależności od stopnia natlenienia wody zmianę ilości hemoglobiny w mięśniach skorupiaków; *Daphnia magna* (Cladocera), *Caenestheria inopinata* (Conchostraca), *Artemia salina* [2, 7] czy larw owada Chi-

ronomus plumosus [35]. Nie stwierdzono podobnej zależności stężenia tlenu i hemoglobiny w mięśniach przełyku u mięczaka *Physa fontinalia* i w parenchymie płazińca *Phaenocora* sp. Niezwykle ciekawy sposób pozyskiwania tlenu odnotowano w przypadku robaka *Phaenocora typhlos* żyjącego w ilach, a więc środowisku niedostatecznie natlenionym. Ilość mioglobiny w mięśniach wymienionego płazińca jest znacznie mniejsza niż u gatunków blisko z nim spokrewnionych (*P. unipunctata*). Gatunek ten pozyskuje tlen na drodze symbiozy wewnątrzkomórkowej. Mianowicie korzysta on z tlenu uwalnianego w dzień przez obecne w jego komórkach *Zoochlorella* [49].

Ilość hemoglobiny tkankowej [mioglobiny] okazała się w zasadzie skorelowana z aktywnością motoryczną bezkręgowców. Roślinożerny mięczak *Aplysia* sp. w mięśniach przełyku posiada hemoglobinę, a spokrewniony z nim gatunek *Navanax* jej nie posiada [30]. Brzuchonóg *Pila vireus* charakteryzuje się 1,5 raza większą zawartością mioglobiny w raduli niż w mięśniu przecierającym żołądka. Wspomniany mięczak posiada w przednich częściach nefrydii hemoglobinę w ilości 2,77 mg/g mokrej tkanki, gdy tymczasem w tylnej części reakcja na mioglobinę jest negatywna [42].

Mięśnie o dużej aktywności motorycznej mają wyraźne czerwone zabarwienie. Jednakże rozmieszczenie barwnika w mięśniach tego samego osobnika nie jest równomierne. U kręgowców spotykamy różnicę w stężeniu mioglobiny mięśniowej 2-krotną, a nawet 8-krotną [2, 46]. U bezkręgowców nierówność barwy u tego samego osobnika obserwujemy zarówno dla tkanki mięśniowej, jak i czerwonej. Przykład *Aphrodite oculata*, u której wszystkie ganglia i struna brzuszna są czerwone, a nerwy obwodowe (boczne) bezbarwne [48].

U *Aplysia californica* barwą czerwoną wyróżniają się ganglia, od nich jeszcze bardziej zabarwione są nerwy obwodowe, a nerwy wychodzące z ganglii w odległości 2-3 cm są już bezbarwne [48].

Aktywność mięśni rośnie w trakcie ontogenezy, czego wyrazem jest przyrost w nich mioglobiny. Mięśnie zwierające u młodych *Mercenaria mercenaria* są bezbarwne, tymczasem u form dorosłych intensywnie różowe. Podobną zależność w ilości Mb stwierdzono wcześniej u kręgowców [33].

Żyjący w Zatoce Woodshol *Busycon canaliculatum* ma w raduli 3-4% mioglobiny, a w mięśniu sercowym ilość jej jest niewykrywalna nawet testem benzydynamowym. Natomiast *Busycon contrarium* z

Zatoki Aligatorów ma 2-3% Mb w mięśniu sercowym, a w raduli 1%. Powyższą różnicę tłumaczy się odmiennymi warunkami hydrochemicznymi i hydrologicznymi panującymi w obu zatokach.

Różnorodność w występowaniu hemoglobiny tkankowej wiąże się z jej podstawową funkcją zaopatrywania w tlen określonych tkanek. Już dość dawno ustalono w organizmach wyższych rolę mioglobiny. Białko to odbiera tlen oksyhemoglobinie tworząc w mięśniach (krótkotrwałą) chwilową jego rezerwę. Podobną rolę przypisuje się hemoglobinie tkanki nerwowej wiedząc, iż swoje czynności neurony bez tlenu kontynuują bardzo krótko. Rolę hemoglobiny z "czerwonego narządu" larw owada *Gastrophilus intestinalis* jest wiązanie tlenu z pojętych przez ten narząd pęcherzyków powietrza gospodarza [37].

Hemoglobina obecna w trachealnych komórkach wodnych pluskwiaków *Buenoa* i *Anisops* nie wydaje się li tylko pełnić funkcje przenośnika tlenu. Bore uważa, że hemoglobina łącząc się z tlenem zwiększa ciężar właściwy owada ułatwiając mu tym samym zanurzenie [3]. Miller stwierdził, iż po połączeniu hemoglobiny *Anisops pellucens* z tlenem okres przebywania zwierząt pod wodą ulega przedłużeniu. Tymczasem po reakcji Hb z CO czas nurkowania ulega skróceniu (do 1/5) i równocześnie owady miały trudności utrzymania równomiernego położenia w zanurzeniu [3]. Nie jest wykluczona możliwość porażenia przez CO systemu nerwowego tych zwierząt. Brak nam również dowodów eksperymentalnych o roli hemoglobiny u robaków.

Istnieje hipoteza, że hemoglobina tkankowa pasożytów, tj. przywr (Trematoda) i nicieni (Nematoda) odbiera gospodarzowi tlen z jego krwi. Przemawiałoby za tym zarówno znaczne stężenie Hb w tkance pasożyta, jak również jej wysokie powinowactwo do tlenu. Stwierdzono, iż hemoglobina nicienia - *Camallanus trispinosus* - pasożytującego w jelitach żółwia *Pseudemys troostii* posiada 3-krotnie wyższe powinowactwo do tlenu w porównaniu z powinowactwem Hb gospodarza. Dzięki temu hemoglobina pasożyta może pobierać tlen nawet z krwi częściowo odtlenionej (żyłnej) [38].

Niektórzy badacze sądzą, iż HbT pasożytów jelitowych jest akceptorem tlenu w warunkach jego szczególnie niskiego ciśnienia parcjalnego, jakie panuje w treści jelitowej. Istnieje jednak uzasadniona wątpliwość pobierania przez pasożyty tlenu ze środowiska

gospodarza. Nie udało się dotychczas bowiem stwierdzić zależności pomiędzy stężeniem tkankowej hemoglobiny pasożyta a ilością tlenu w otaczającym go środowisku. Przypuszcza się, że Hb niektórych pasożytujących robaków, stanowi depozyt tlenu, z którego zwierzęta korzystają w okresie jego deficytu. W szczególności odnosi się to do nicienia *Nippostrongylus muris* pasożytującego w jelicie cienkim szczura i przywry *Castrothylax crumenifer* pasożyta bawołów [9]. Istnieje też przypuszczenie, iż mioglobina z przedniej części nefridiów brzuchonoga *Phila virens*, spełniając funkcję magazynu tlenowego, ułatwia dyfuzję tego gazu w głąb tkanek. Analogiczną rolę przypisuje się mioglobinie mięśniowej przywry *Proctoeces subtenuis* żyjącej w nerce małża *Scrobicularia plana* [8].

R o s s i - F a n e l l i dosyć już dawno zwrócił uwagę na dodatkową katalityczną funkcję białek oddechowych [39]. Podobnie jak hemoglobina krwi również mioglobina posiada peroksydazową aktywność. Również w roztworach mioglobiny zachodzi spotęgowana dyfuzja tlenu [34] (ułatwiona dyfuzja - Facilitated diffusion).

Nadal nie wyjaśnioną pozostaje rola homoglobiny w jajach bezkręgowców. Istnieje dowód na to, iż obecna w partenogenetycznych jajach skorupiaków Hb przyspiesza ich rozwój. Jest oczywistym, że nie jest to podstawową funkcją hemoglobiny jaj. W pierwszym rzędzie musi ona zabezpieczyć rozwijający się organizm w niezbędną dla niego ilość tlenu. Rozwój jaj zachodzi bowiem w niesprzyjających warunkach tlenowych bądź to w komorze lęgowej (*Daphnia*), w słonej wodzie (*Artemia*) czy w pobliżu dna, gdzie składują jaja szczenice. W takich to przypadkach, celem pozyskania tlenu, hemoglobina ta powinna charakteryzować się bardzo wysokim powinowactwem tlenowym [37]. Nadal również nie wyjaśniona pozostaje rola hemoglobiny w jajach pasożytujących bezkręgowców, jak glisty, pluskwy pościelowej czy wszy ludzkiej. Podobnie nie wyjaśniono roli hemocyjaniny obecnej w jajach pancerzowców: kraba włochatoszczypcowego i innych krabów. Jest to tym bardziej zastanawiające, iż jaja te rozwijają się w środowisku raczej dostatecznie nasyconym tlenem. Przypuszcza się, iż hemocyjanina pełni tu potrójną rolę [4]. Jest niewątpliwie przenośnikiem tlenu, będąc równocześnie dla rozwijającego się organizmu źródłem miedzi i białka. Właściwości fizykochemiczne hemoglobin tkankowych sprowadzają je do efektywnego wypełniania określonych czynności fizjo-

logicznych. Przede wszystkim będzie to bardzo wysokie ich powinowactwo do tlenu szczególnie w tych przypadkach, kiedy warunki bytowania zwierząt odnoszą się do niskiego ciśnienia parcjalnego tego gazu (tab. 5).

T a b e l a 5

Powinowactwo tlenowe (p_{50}) HbT niektórych bezkręgowców

Gromada	Gatunek	p_{50} (Pa)
Typ Plathelminthes		
Trematoda	Fasciola hepatica	nieznaczone
Typ Nematelminthes		
Nematoda	Ascaris lumbricoides	65,17
	Camallanus trispinosus	1 064
	Diectophyme renale	nieznaczone
	Haemonchus contortus	6,65
	Nematodirus sp.	6,65
	Nippostrongylus brasiliensis	13,3
Typ Annelida		
Polychaeta	Aphrodite aculeata	146,30
	Travisia pupa	10,64
Echiuroidea	Arhynchite pugettensis	1 463
Typ Mollusca		
Loricata	Cryptochinon stelleri	284,62
Bivalvia	Mercenaria mercenaria	73,15
	Phacoides pectinatus	11,97
Gastropoda	Aplysia californica	532
	Aplysia depilans	359,10
Typ Arthropoda		
Insecta	Gastrophilus intestinalis	2,66

Hemoglobiny tych zwierząt posiadają zadziwiającą właściwość osiągania stanu półnasycenia (p_{50}) przy ciśnieniach wynoszących zaledwie 0,1 lub 0,01 mm Hg. Tak np. p_{50} hemoglobiny "czerwone-

go narządu" larwy *Gastrophilus intestinalis* w określonych warunkach ma wartość 0,02 mm Hg. To wysokie powinowactwo jest wielce korzystne dla larwy, zważywszy niskie ciśnienie tlenu panujące w żołądkach koni. Wysokie powinowactwo stwierdzone też w przypadku hemoglobin nicieni pasożytujących w układzie pokarmowym kręgowców (tab. 5). Jeżeli krew (hemolimfa) bezkręgowców zawiera barwnik oddechowy, to okazało się prawie powszechną zasadą, iż jego powinowactwo do tlenu jest niższe niż białka oddechowego tkanek. Właściwości te ułatwiają przenoszenie tlenu z barwnika krążącego do określonej tkanki. Przy tym spotkane różnice są znaczne. Mioglobina wieloszczeta *Travisia* pupa ma powinowactwo 5-krotnie wyższe od powinowactwa hemoglobiny celomy [31]. Ta ogólna reguła różnego powinowactwa dotyczy także białek oddechowych nie należących do jednej grupy. Półnasycenie mioglobiny mięśniowej (hemo-proteina) niektórych brzuchonogów (*Fusitriton oregonensis*) i pancerzowców (*Ischnochiton conspicus*, *Katharina tunicata*), ma miejsce przy niższych wartościach ciśnienia tlenu niż wysycenie w 1/2 obecnej w ich hemolimfie - hemocyjaniny (miedzioproteina) [32]. Podobnie zachowuje się mioglobina *Busycon canaliculatum*, kiedy porównamy jej powinowactwo z obecną w hemolimfie tego mięczaka hemocyjaniną. Tak różne własności dwóch barwników oddechowych spotykamy u kręgowców w relacji hemoglobin płodu i matki (HbF, HbA) czy hemoglobina i mioglobina [10, 17].

Z drugiej strony zdarzają się też dotychczas nie wyjaśnione przypadki niskiego powinowactwa białka tkankowego do tlenu. Mioglobina szczetnic *Arhyndute pugettensis* ma bardzo niskie powinowactwo do tlenu ($p_{50} = 11$ mm Hg). Równie obecny w jej celomie barwnik osiąga pół nasycenie przy 3,4-4,0 mm Hg. Tymczasem zwierzę to żyje w ile dennym, wręcz w warunkach niedoboru tlenowego [32].

Na zakończenie dwa słowa wyjaśnienia za używaniem (stosowaniem) nazwy: hemoglobina tkankowa. U kręgowców barwnikiem oddechowym krwi jest hemoglobina. Białko to zbudowane jest z 2 łańcuchów polipeptydowych tworzących tetramer o masie 68 000 D. Wyodróżniającą cechą tego białka jest efekt allosteryczny. Drugim białkiem oddechowym kręgowców jest mioglobina monomer o masie 17 000 D. Poza masą, białka te różnią się powinowactwem do tlenu, CO, kształtem krzywej dysocjacji itp.

Jedyny odbiegający od przedstawionego schematu przypadek, to hemoglobina minoga. Po odtlenowaniu hemoglobina ta tworzy dimer, a łącząc się z tlenem dysocjuje na monomery. Hemoglobiny niektórych kręgowców (żaba, mysz) *in vitro* polimeryzują, tworząc formy oktameryczne. Wszystkie hemo- i mioglobiny kręgowców zbudowane są wg ogólnego wzoru ustalonego przez K e n d r e w i P e r u t z a, a ich właściwości częściowo opisane [10, 23, 28].

U bezkręgowców spotykamy z białkami oddechowymi sytuację bardziej złożoną. Przede wszystkim ich występowanie nie ogranicza się do krwi i mięśni, ale oprócz wymienionych tkanek spotykamy je w układzie nerwowym, w układzie wydalniczym i różnych narządach. Zdarza się, iż u niektórych bezkręgowców hemoglobina obecna jest tylko przy niskim stężeniu tlenu, zanikając z chwilą zwiększonego natlenienia (*Daphnia*). Hemoglobina bezkręgowców zlokalizowana w erytrocytach ma zróżnicowaną masę cząsteczkową w zakresie 18 000-73 000 D. Natomiast hemoglobiny rozpuszczonej w hemolimfie jest dużo więcej (328 000-4 000 000 D). Już tylko porównanie mas wskazuje na wielce zróżnicowaną budowę hemoglobin bezkręgowców. Przy tym mamy przypadki występowania u tego samego osobnika kilku frakcji hemoglobinowych, z których jedne są monomerami (15 900) inne dimerami (25-31 000). Obecne w różnych tkankach bezkręgowców hemoproteiny mają zawsze mniejszą masę od białek oddechowych krwi (hemolimfy). Najmniejszą masę ma barwnik wyizolowany z tkanki nerwowej *Aplysia californica* - 16 400, największą jest hemoproteina z mięśni raduli *Busycon contrarium* (34 300).

Ta różnorodność występowania, rozmiarów i właściwości sprawia, że coraz częściej stosujemy podwójną nazwę, dodając do słowa hemoglobina informację o jej budowie: monomer, dimer itp.

Niepełne dane o fizykochemicznych właściwościach białek oddechowych bezkręgowców utrudniają ich porównanie. Dotyczy to białek obecnych u jednego osobnika, w szczególności układów: mioglobina - hemocyjanina; mioglobina - hemoglobina (rozpuszczona); mioglobina - hemoglobina (erytrocytarna) czy miohemoerytryna - hemoerytryna.

LITERATURA

- [1] Adamska M., Gondko R., Acta Univ. Lodz., Folia biochim. biophys., 2, 119-126 (1983).
- [2] Alakrinskaja J. O., Gienoglobiny i gienocianiny bezpozwo-
ncznych, Nauka, Moskwa 1979.
- [3] Bare, Miller, cyt. Redmond, poz. 26.
- [4] Busselen P., Comp. Biochem. Physiol., A, 38, 317-328 (1971).
- [5] Dmochowski A., Kosmos, 49 (1924).
- [6] Florkin M., Chemical Zoology, Acad. Press, New York, London 236
(1966).
- [7] Fox H. M., Proc. Roy. Soc., 143, 203-211 (1955).
- [8] Freeman R. F. H., Comp. Biochem. Physiol., 10, 253-256 (1963).
- [9] Goil M. M., Z. Parasitenk., 19, 362-363 (1960).
- [10] Gondko R., Post. Biochem., 11, 169-178 (1965).
- [11] Gondko R., Leyko W., Połączenia nukleotydów z białkami
oddechowymi, Łódzkie Tow. Nauk., Łódź 1969.
- [12] Gondko R., Alikhan M. A., Leyko W., Acta Univ.
Lodz., S. II, z. 19, 279-331 (1976).
- [13] Gondko R., Michalak W., Invertebrate Oxygen Binding Pro-
teins Structure, Active Site and Function, ed. J. Lamy, J. La-
my, New York, Basel. 1981, s. 41-47.
- [14] Goodwin T. W., Physiology of crustacea, Acad. Press, New York,
London, 1, 101-140 (1960).
- [15] Hoffman R. J., Mangum C. P., Comp. Biochem. Physiol., 36,
211-228 (1970).
- [16] Hoppe-Seyler F., Arch. Path. Physiol., 29, 233-235 (1864).
- [17] Hryniewicz J., Gondko R., Acta Univ. Lodz., Folia
biochim. biophys., 1, 101-119 (1981).
- [18] Hungeford H. B., Canad. Entomol., 54, 263 (1922).
- [19] Hunefeld R., J. Prak. Chem., 16, 152-155 (1839).
- [20] Irzak J. L., Gienoglobiny i ich swoistwa, Nauka, Moskwa 1975.
- [21] Keilin D., Parasitology, 36, 1-66 (1944).
- [22] Kilias R., "Mollusca" in Wirbellose Tiere Jena, Bd. 1, Berlin
Urania Tierreich 1967, s. 318.
- [23] Kwiatkowska J., Post. Biochem., 14, 27-47 (1968).
- [24] Kunicki-Goldfinger W., Dziedzictwo i przyszłość, Warsza-
wa 1974.

- [25] Lankester R. A. J., Anat. Physiol., 3, 119 (1869).
- [26] Lankester R. A., Proc. Soc., 21, 70-81 (1872).
- [27] Leyko W., Związki adeninowe krwi ludzkiej, Łódź 1959.
- [28] Leyko W., Buczek L., Post. Biochem., 6, 393 (1960).
- [29] Leyko W., Dmochowski A., Buczek L., Gondko R., Zesz. Nauk. UŁ, S. II, 12, 37 (1962).
- [30] Manwell C., Comp. Biochem. Physiol., 53, 341-352 (1958).
- [31] Manwell C., Comp. Biochem. Physiol., 1, 267-276 (1960).
- [32] Manwell C., Arch. Biochem. Biophys., 89, 194-201 (1960).
- [33] Manwell C., Comp. Biochem. Physiol., 8, 209-218 (1963).
- [34] Millikan G. A., J. Physiol., 87, 38 (1936).
- [35] Osmulski P., Comp. Biochem. Physiol., in press. (1984).
- [36] Read K. R. H., Biol. Bull., 123, 605-617 (1962).
- [37] Redmond J. R., Chemical Zoology, Acad. Press, New York, London 1971, s. 119-143.
- [38] Rogers W. P., Austral. J. Sci. Ser. B., 2, 287-303 (1949).
- [39] Rossi-Fanelli A., Etude de biologie et de pathologie, 229 (1950).
- [40] Southward E. C., Nature, 200, 798-799 (1963).
- [41] Stryer L., Biochemistry, W. H. Freeman-San Francisco 1981.
- [42] Suyranarayanan H., Aleksander K. M., Comp. Biochem. Physiol., A, 44, 1157-1162 (1973).
- [43] Sympozjum pt. Modyfikacja biopolimerów czynnikami fizycznymi i chemicznymi, Łódź 1980.
- [44] Wawrzyczek W., Twórcy chemii, Warszawa 1959.
- [45] Wells R. M. G., Invertebrate Respiration, E. Arnold, London 1980.
- [46] Werbołowicz P. A., Mioglobiny i ich rol w fizjologii i patologii zwierząt i człowieka, Medgiz 1961.
- [47] Wierzbicki R., Fizykochemiczne i funkcjonalne właściwości hemoglobiny jąder erytrocytów ptaków, Łódź 1974.
- [48] Wittenberg B. A., Briehl R. W., Wittenberg J. B., Biochem. J., 96, 365-371 (1965).
- [49] Young J. O., Harris J. H., Freshwater Biol., 3, 85-88 (1973).

Roman Gondko, Maria Adamska

TISSUE HEMOGLOBINS IN INVERTEBRATES

In invertebrates various proteins play the role of oxygen transporter. They are dissolved in fluids of the respiratory system or present in its cells. These proteins occur also in other tissues, and therefore are called tissue hemoglobins.

They play an important role evidenced by occurrence in tissues of animals possessing no other respiratory proteins in their blood or hemolymph.

This paper presents the occurrence of hemoglobins in the animal kingdom and their physico-chemical properties, with special attention paid to the oxygen affinity.