### Гемоглобин

Гемоглобин-сложный белок, хромопротеид, дыхательный пигмент крови человека, позвоночных и некоторых беспозвоночных животных. Основная функция гемоглобина - перенос кислорода от органов дыхания к тканям.

Химически гемоглобин относится к группе хромопротеидов. Молекула гемоглобина состоит из белковой части-глобина и простетичной группы небелковой природы-гема, в состав которого входит железо. В одной молекуле гемоглобина содержится 4 простетических группы. В 100мл крови здорового человека содержится 13-16г гемоглобина. Железо, которое содержится в гемме, способно образовывать с молекулами кислорода легкораспадающееся соединение при прохождении эритроцита чрез капиллыры легких, а при прохождении через сосуды других органов-отдавать кислород и связываться с углекислотой, которую гемм затем отдает, когда эритроцит вновь попадает в капилляры легких. Кровь, протекающая по артериям насыщена кислородом, имеет ярко-алый цвет; после поглощения кислорода тканями и связывания гемоглабина с углекислотой кровь приобретает темно-красный цвет(эта кровь протекает по венам).Помимо гемоглобина крови, у ряда животных в ритмически работающих мышцах с интенсивным обменном(мышца сердца) имеется мышечный гемоглобин(миоглобин), близкий по своему составу и свойствам к гемоглобину крови.

Альфа-полипептидная цепь заканчивается комбинацией аминокислот валина-лейцина, а бета-полипептидная цепь - комбинацией валина-гистидина-лейцина. Альфа- и бета-полипептидные цепи в гемоглобиновой молекуле не размещены линейно, как это выглядит на первый взгляд из данных, это первичная структура . По причине существования интрамолекулярных сил, полипептидные цепи скручиваются в форме типичной для белков альфа-геликсовой спирали -вторичная структура. Сама альфа-геликсовая спираль на каждую альфа- и бета-полипептидную цепь огибается пространственно, образуя сплетения овоидной формы ,третичная структура. Отдельные части альфа-геликсовых спиралей полипептидных цепей отмечают латинскими буквами от А до Н . Все четыре третично изогнутые альфа- и бета-полипептидные цепи располагаются пространственно в определенном соотношении- кватернерная структура. Они связаны между собой не настоящими химическими связями, а межмолекулярными силами.

Сведберговой единицей называется комплекс, составленный из одного гема и одной альфа-, респ. бета-полипептидной цепи. Явно гемоглобиновая молекула состоит из четырех Сведберговых единиц. Молекулярный вес гемоглобина равен 64458, т.е. на один атом железа, соответственно приблизительно на Сведбергову единицу полагается по 16115.

Кроме координационной связи, существующей между полипептидными цепями глобина, Fe++ атом гема располагает еще тремя координационными связями , две из которых соединены двумя азотными атомами порфиринового кольца, а третья, в среде с низким парциальным давлением кислорода, связана с одной молекулой воды . В среде с высоким парциальным давлением кислорода (артериальная кровь), третья координационная связь соединена с одной молекулой кислорода, причем получается соединение - оксигемоглобин . Путем непрерывного превращения оксигемоглобина в редуцированный гемоглобин и обратно, осуществляется перенос кислорода из легких к тканям.

Особенно значительным отличаем гемоглобина от миоглобина является кривая насыщения кислородом, которая имеет сигмоидную форму . Значит возможность гемоглобина связывать кислород зависит от того, заключаются ли в данном тетрамере другие молекулы кислорода. Если содержатся, то последующие молекулы кислорода присоединяются легче. Таким образом, для гемоглобина свойственна кинетика кооперативного связывания , благодаря которой он объединяет максимальное количество кислорода в легких и отдает максимальное количество кислорода при тех парциальных давлениях кислорода, которые имеют место в периферических тканях.

Величина Р50 - значение парциального давления кислорода характеризует сродство гемоглобинов к кислороду. Р50 у разных организмов существенно различается, но во всех случаях оно превышает значение парциального давления кислорода в периферических тканях рассматриваемого организма. Это показывает фетальный гемоглобин человека (НВF). Для HbA Р50=26 мм. рт. ст., а для HbF Р50=20 мм. рт. ст. Благодаря этой разнице гемоглобин F отбирает кислород у HbA, находящегося в плацентарной крови. Однако после рождения ребенка HbF утрачивает свою функцию; обладая более высоким сродством к кислороду, он высвобождает меньшее его количество в тканях.

У гемоглобина есть еще одна немаловажная функция, он ускоряет транспорт углекислого газа от тканей к легким. Гемоглобин связывает углекислый газ сразу после высвобождения кислорода; примерно 15% углекислого газа, присутствующего в крови, переносится молекулами гемоглобина. Находящаяся в эритроцитах карбоангидраза катализирует превращение поступающего из тканей углекислого газа в угольную кислоту . Угольная кислота быстро диссоциирует на бикарбонат-ион и протон, причем равновесие вдвинуто в сторону диссоциации. Для предотвращения опасного повышения кислотности крови должна существовать буферная система, способная поглощать избыток протонов. Гемоглобин связывает два протона на каждые четыре освободившиеся молекулы кислорода, определяя буферную емкость крови. В легких идет противоположный процесс: присоединение кислорода к дезоксигемоглобину сопровождается высвобождением протонов, которые связываются с бикарбонат-ионами, переводя их в угольную кислоту. Далее эффективно действующая карбоангидраза катализирует превращение угольной кислоты в углекислый газ, выдыхаемый из легких. Следовательно, связывание кислорода тесно сопряжено с выдыханием углекислого газа. Это явление называется эффектом Бора.

Этот эффект -свойство тетрамерного гемоглобина и определяется гем-гемовым взаимодействием, лежащим в основе кооперативных эффектов.Протоны, ответственные за эффект Бора, высвобождаются в итоге разрушения солевых мостиков, которым сопровождается связывание кислорода с Т-структурой; они отсоединяются от атомов азота остатков гистидина (146) в бета-цепях. Эти протоны сдвигают соотношение в сторону образования угольной кислоты, которая расщепляется карбоангидразой с образованием углекислого газа .Напротив, при высвобождении кислорода вновь складывается Т-структура с присущими ей солевыми мостиками, при создании которых совершается присоединение протонов к остаткам гистидина в бета-цепях. Таким образом, в периферических тканях протоны благоприятствуют образованию солевых мостиков путем. Образование солевых мостиков вызывает освобождение кислорода из оксигенированной R-формы гемоглобина.

Следовательно, увеличение концентрации протонов содействует освобождению кислорода, а повышение концентрации кислорода стимулирует высвобождение протонов . Первый результат выражается в сдвиге кривой диссоциации кислорода вправо при росте концентрации ионов водорода (протонов).

Обычная концентрация гемоглобина у взрослого человека от 80 до 115% ,за среднюю величину принимают 100% . Типичные величины у мужчин приблизительно на 10% выше , чем у женщин .У ребенка же нормальная концентрация гемоглобина существенно различается от норм у взрослого. Эти особенности показаны в табл.

Средняя концентрация гемоглобина в крови в периоды детского возраста. Максимальные колебания средних величин+/-12%

--------------------------------------------------------------

Возраст¦Первые 4дня¦2 1/2 мес¦1 год¦2 года¦4 года¦8 лет¦12 лет

--------------------------------------------------------------

КонцHb ¦ 19,5 ¦ 11,5 ¦12,0 ¦ 12,1 ¦ 12,5 ¦13,0 ¦ 13,4

У детей в раннем возрасте нет различия между мужским и женским полом.

В наше время существует немало способов нахождения концентрации гемоглобина. Сюда можно отнести колориметрические методы ,при которых гемоглобин колориметрируют как оксигемоглобин или редуцированный гемоглобин или же сперва превращают его в цветные производные .К этой группе можно причислить и первый метод для определения гемоглобина, предложенный Велькером в 1854 году и модифицированный Тальквистом, суть которого заключалась в том, что цвет капли крови на фильтровальной бумаге сравнивают с серией цветных бумажных стандартов. Другой исследователь,на основании превращения гемоглобина в солянокислый гематин и связанных с этим изменений в электрической проводимости, предложил электронный метод определения концентрации гемоглобина.Также существуют газометрические методы . При этом гемоглобин насыщают газом, например кислородом, окисью углерода (СО). По доле поглощенного газа определяют о количестве гемоглобина. Долю кислорода находят прибором ван-Слайка, прибором Баркрофта или каким-нибудь другим аппаратом для определения кислорода. Имеются методы, основанные на определении железа в гемоглобиновой молекуле . Так как гемоглобиновая молекула содержит точно определенное количество железа (0,0347%), по его количеству устанавливается и количество гемоглобина.

Существует такое понятие,как метгемоглобин. Метгемоглобином называется производное гемоглобина, в котором двухвалентный атом железа переходит в трехвалентный. В эритроцитах в ходе обмена всегда формируются известные количества метгемоглобина, который, все-таки, восстанавливается обратно в гемоглобин под влиянием фермента метгемоглобинредуктазы, так что в цельной крови здорового человека метгемоглобин не превышает 2% общего содержания гемоглобина (0,03-0,3 г%).

Химическая структура сульфогемоглобина не выяснена. Вероятно, две виниловые группы гемоглобина соединяются, посредством SО2-мостиков, с соседними метиновыми связями. В норме, сульфогемоглобина в крови нет. Он появляется при отравлениях соединениями сурьмы, фенацитином, бромом, сульфонамидами, нитратами (колодезная вода), серными соединениями и пр.

Определение сульфогемоглобина в крови можно произвести спектроскопически. Сульфогемоглобиновый спектр не изменяется от прибавления сульфида аммония, но исчезает от прибавления Na2S2О4 и 2 мл 10% едкого натра, или нескольких капель 3% перекиси водорода.

ТИПЫ ГЕМОГЛОБИНА

Недавно еще считалось, что гемоглобин взрослого человека представляет собой одно единственное соединение. Известно было только то, что в эмбриональной жизни имеется особенный тип гемоглобина, называемый HbF, в 155 раз более устойчивый к n/12 натриевой щелочи, чем нормальный гемоглобин. В последнее время, благодаря работам Полинга и его сотрудников и др., выяснилось, что гемоглобин взрослого человека и при нормальных, и при патологических состояниях не представляет собой гомогенного химического соединения. Открыто было много нормальных и патологических типов гемоглобина, которые представили в новом свете обмен гемоглобина и указали пути для исследования патогенеза некоторых анемий. Установлено было, что при некоторых заболеваниях наблюдаются особые типы гемоглобина, характерные для данной анемии. Типы гемоглобина имеют большое значение не только для диагноза, но и перемежают вопрос о патогенезе анемии из чисто морфологической области в биохимическую. Анемии, вызванные появлением патологического типа гемоглобина, называются гемоглобинопатиями или гемоглобинозами.

Выяснилось, что у человека имеются три основных типа нормального гемоглобина: эмбриональный U , фетальный - F и гемоглобин взрослого человека - А. HbU (назван по начальной букве слова uterus) встречается в эмбрионе между 7 и 12 неделями жизни, затем он исчезает и появляется фетальный гемоглобин, который после третьего месяца является основным гемоглобином плода. Вслед за этим появляется постепенно обыкновенный гемоглобин взрослого человека, называемый Hb A, по начальной букве английского слова "adult". Количество фетального гемоглобина постепенно уменьшается, так что в момент рождения 80% гемоглобина представляет собой Hb A и только 20% - HbF. После рождения фетальный гемоглобин продолжает убывать и к 2-3 году жизни составляет всего 1-2%

. Тоже количество фетального гемоглобина и у взрослого. Количество HbF, превышающее 2% считается патологическим для взрослого человека и для детей старше 3 лет.

Кроме нормальных типов гемоглобина в настоящее время известно свыше 50 его патологических вариантов. Они сначала были названы латинскими буквами. Буква В в обозначениях типов гемоглобина отсутствует, т.к. ею обозначен первоначально Hb S. Вскоре выяснилось, что букв азбуки не хватит для обозначения всех патологических типов гемоглобина. Поэтому стали применять для этого имена пациентов, больниц, лабораторий, названия мест и округов. Самой удобной является номенклатура по структурной формуле .

Как нормальные, так и патологические типы гемоглобина различаются не по структуре протопорфиринового кольца, а построению глобина. Разница может заключаться в изменении целых пар полипептидных цепей в гемоглобиновой молекуле, или при сохранении тех же полипептидных цепей, замещаются на определенном месте в первичной структуре одна аминокислота другой.

Первая возможность встречается у гемоглобинов H, F, Бартс, А2 и U. Вместо нормальной структуры гемоглобина А - альфа-альфа/бета-бета, соответственно альфа2/бета2, гемоглобин Н имеет структуру бета-бета-бета-бета, соответственно бета4, что значит, что по обе альфа-полипептидные цепи замещены новыми двумя бета-полипептидными цепями. У гемоглобинов F, Бартс и А2 появляются две новые цепи, обозначаемые гамма и дельта, а у гемоглобина U новая цепь, обозначаемая ипсилон. Структура HbF альфа-альфа/гамма-гамма, соответственно альфа2/гамма2, структура гемоглобина Бартс гамма-гамма-гамма-гамма, соотв. гамма4, структура HbА2 альфа-альфа/дельта-дельта, соответственно альфа2/гамма2, структура гемоглобина U - альфа-альфа/ипсилон-ипсилон, соответственно альфа2/ипсилон2.

Патологические гемоглобины, которые состоят из четырех одинаковых полипептидных цепей, обозначают тетрамерами. Тетрамеры альфа и дельта до сих пор in vivo не наблюдались. Вторая возможность встречается у большинства типов гемоглобина. Так например единственная разница между HbS и HbA состоит в том, что на 6-ом месте в бета-полипептидной цепи вместо глутамина находится валин, единственная разница между

HbI и HbA в том, что на 16-ом месте в альфа-полипептидной цепи лизин замещен аспарагиновой кислотой. Когда аномалия состоит в замещении аминокислоты в альфа-полипептидной цепи, то говорят об альфа-аномалии, когда состоит в бета-полипептидной цепи - о бета-цепной аномалии, когда в гамма-полипептидной цепи - о гамма-цепной аномалии (патологические варианты HbF) и когда в дельта-цепи - о дельта-цепной аномалии (патологические варианты HbA2).

При изучении гемоглобиновых типов имеет большое значение вопрос о структуре глобинов. С одной стороны, структура является самым верным способом отдифференцирования отдельных типов гемоглобина один от другого, с другой стороны создается возможность для составления строго научной номенклатуры последних.

МЕТОДЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ВИДОВ ГЕМОГЛОБИНА

1. Для разграничения отдельных типов человеческого гемоглобина пользуются электрофорезом на блоке крахмала, на крахмальном геле, на геле агара, на целлюлозно-ацетатных листах, на акриламидном геле, на карбоксиметилцеллюлозном геле, электрофорезом при высоком напряжении тока.

2. Вторым по значению методом, которым пользуются в настоящее время для дифференциации отдельных видов гемоглобина, является хроматография. Особенно хорошие результаты получается при употреблении в качестве адсорбирующего вещества ионообменной смолы амберлита и ионообменный декстрановый гель

3. Для разграничения некоторых видов гемоглобина пользуются также их растворимостью в некоторых растворителях. Наиболее известным тестом этой группы является проба Итано для доказательства наличия HbS. При этой пробе нам служит то обстоятельство, что редуцированный HbS осаждается в 2,24 m буфере, в противоположность другим типам гемоглобина. Проба эта имеет значение в особенности для дифференцирования HbS и HbD, потому что, HbS и HbD обладают одинаковой электрофоретической и хроматографической подвижностью.

4. Для отличия HbA от HbF пользуются, как было подчеркнуто выше, устойчивостью при денатурации растворами натриевой щелочи. Это известный в истории метод, которым Кербер в 1886 году дифференцировал HbA и HbF.

5. Гемоглобины группы F отличается от других гемоглобиновых типов и по своей характерной триптофановой полосе при 289,8 нм ультрафиолетового спектра. Гемоглобины, обладающие группой М, не имеют абсорбционной полосы при длине волны 630 нм, но зато показывают увеличенную абсорбцию при 600 нм.

6. " Отпечатковый метод” .Дело касается важнейшего метода установления "первичной структуры" гемоглобина при различных гемоглобиновых типах. Исследуемый гемоглобин гидролизуют трипсином, при чем полипептидные цепи глобиновой молекулы распадаются на большое число пептидов. Пептидную смесь подвергают электрохроматографии на бумаге, т.е. в одном направлении проводится электрофоретическое, в другом хроматографическое разделение. Получаются характерные для отдельных типов гемоглобинов электрохроматограммы, по которым их можно точно различить . Определение аминокислотного состава отдельных пептидов дает возможность первичную структуру глобина соответствующего гемоглобинового типа. Делая аналогию с соответствующей по сложности и точности криминалистической техникой для изучения отпечатков пальцев рук, он был назван "пальцеотпечатковым" ("fingerprint") методом.

Так называемым " рекомбинационным " или " гибридизационным " методом можно воспользоваться для установления состава полипептидных цепей в каком-нибудь гемоглобиновом типе .Если смешать известный и неизвестный гемоглобин при рН 4,3,они диссоциируют полумолекулами, состоящими из соответствующих пар полипептидных цепей. Полипептидные пары снова комбинируются в целые гемоглобиновые молекулы после нейтрализации раствора, при чем могут получится и новые "гибридные" гемоглобиновые молекулы. Их идентифицирование электрофоретическим способом или хроматографией позволит сделать заключение о полипептидной структуре неизвестного гемоглобинового типа. Этот метод предназначен также преимущественно для научных исследовательских целей.

Существуют также способы цитологического определения типа гемоглобина в эритроцитах на мазке крови. Присутствие HbF в эритроцитах можно обосновать путем обработки кровяного мазка лимоннокислой буферной смесью с рН 3,2-3,6. При этих условиях HbA извлекается и эритроциты, в которых он преобладал, остаются только в виде эритроцитных теней, тогда как HbF сохраняется и эритроциты, содержащие преимущественно этот тип гемоглобина, сохраняют свое содержание.

Помимо всех этих методов при дифференциации некоторых типов гемоглобина пользуются также разницей в кристаллическом строении, изоэлектрической точке и т.д.

Рассмотрим гемоглобин S, в котором остаток Glu А2бета замещен на Val. Он располагается на поверхности молекулы гемоглобина и контактирует в водой, и замещение полярного остатка Glu на неполярный Val ведет к появлению на поверхности бета-субъеденицы "липкого участка". Этот липкий участок наличествует как в оксигенированном, так и в дезоксигенированном гемоглобине S ,в гемоглобине А отсутствует.

Существует комплементарный участок на поверхности дезоксигенированного гемоглобина, который способен крепко соединяться с липким участком бета-субъединицы, тогда как в оксигенированном гемоглобине этот участок маскируется другими группами . Когда гемоглобин S переходит в дезоксигенированное состояние, его липкий участок связывается с комплементарным участком на другой молекуле дезоксигенированного гемоглобина, тем самым совершается полимеризация дезоксигемоглобина S и его осаждение в виде длинных волокон.

Волокна дезоксигемоглобина S механически деформируют эритроцит, предавая ему серповидную форму, что приводит к лизису клеток и множеству вторичных клинических проявлений. Следовательно, если бы можно было можно поддерживать гемоглобин S в оксигенированном состоянии или хотя бы свести к минимуму концентрацию дезоксигенированного гемоглобина S, то получилось бы предотвратить полимеризацию дезоксигенированного гемоглобина S и формирование "серповидных" клеток. Полимеризации подвержена Т-форма гемоглобина

S. При серповидноклеточной анемии: гемоглобин S в ферри-состоянии (метгемоглобин S) не подвержен полимеризации, поскольку он стабилизирован в R-форме. В дезоксигемоглобине А тоже есть рецепторный участок, способный взаимодействовать с липким участком оксигенированного или дезоксигенированного гемоглобина S , но присоединения "липкого" гемоглобина S к дезоксигемоглобину А мало для создания полимера, так как сам дезоксигемоглобин А липкого участка не заключает в себе и не может объединять следующую молекулу гемоглобина. Значит, связывание дезоксигемоглобина А с R- или Т-формой гемоглобина S перекрывает полимеризацию. Спиральные фибрилярные структуры формируются в результате полимеризации дезоксигемоглобина S. При этом каждая молекула гемоглобина контактирует с четырьмя соседними молекулами . Создание подобных трубчатых волокон ответственно за механические нарушения в содержащем их эритроците.

Существует еще одна группа патологий -талассемия, которые связанны с аномалиями гемоглобина . В их характеристику входит сниженная скорость синтеза альфа-цепей гемоглобина (альфа-талассемия) или бета-цепей (бета-талассемия). Это приводит к анемии, которая может принимать очень тяжелую форму.

В наше время проводятся много исследований, которые позволяют выясненить молекулярные приспособления, отвечающие за развитие талассемии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Р.Марри, Д.Греннер, П.Мейес, В.Родуэлл, Биохимия человека, том 1, "Мир", Москва 1993г., стр.52

2. И.Тодоров, Клинические лабораторные исследования в педиатрии, "Медицина и физкультура",София 1968г., стр. 278-281

3. Р.Марри, Д.Греннер, П.Мейес, В.Родуэлл, Биохимия человека, том 1, "Мир", Москва 1993г., стр.56-59

4. И.Тодоров, Клинические лабораторные исследования в педиатрии, "Медицина и физкультура",София 1968г., стр.283-284

5. тоже стр.293

6. тоже стр.285-286

7. тоже стр.293-304

8. Р.Марри, Д.Греннер, П.Мейес, В.Родуэлл, Биохимия человека, том 1, "Мир", Москва 1993 г.6 стр. 60-62

9. Dean J., Schechter A.N. Sickle-cell anemia: Molekular and lubar basis of therapeutic approaches. (3 parts), N.E.Med., 1978, 299, 752, 804, 863.

10. Klotz I.M., Haney D.N., King L.C. Ritional approaches chemotherapy: Antisickling agents, Sience, 1981, 219