

ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАНИЕ

БИОХИМИЯ:

СТРОЕНИЕ И РОЛЬ БЕЛКОВ ГЕМОГЛОБИНОВОГО ПРОФИЛЯ

Ю. А. Кривенцев, Д. М. Никулина

2-е издание



УМО СПО рекомендует

 **Юрайт**
Издательство
biblio-online.ru

Ю. А. Кривенцев, Д. М. Никулина

БИОХИМИЯ: СТРОЕНИЕ И РОЛЬ БЕЛКОВ ГЕМОГЛОБИНОВОГО ПРОФИЛЯ

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ ДЛЯ СПО

2-е издание, переработанное и дополненное

Рекомендовано Учебно-методическим отделом среднего профессионального образования в качестве учебного пособия для студентов образовательных учреждений среднего профессионального образования

**Книга доступна в электронной библиотечной системе
biblio-online.ru**

Москва ■ Юрайт ■ 2019

УДК 577.1(075.8)
ББК 28.072я73
К82

Авторы:

Кривенцев Юрий Алексеевич — доцент, доктор медицинских наук, доцент кафедры биологической химии Астраханского государственного медицинского университета;

Никулина Дина Максимовна — профессор, заведующая кафедрой биологической химии Астраханского государственного медицинского университета.

Рецензенты:

Терентьев А. А. — доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук, заведующий кафедрой биохимии лечебного факультета Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н. И. Пирогова (г. Москва);

Быков И. М. — доктор медицинских наук, профессор, декан, заведующий кафедрой стоматологического факультета Кубанского государственного медицинского университета министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Краснодар).

Кривенцев, Ю. А.

К82 Биохимия: строение и роль белков гемоглобинового профиля : учеб. пособие для СПО / Ю. А. Кривенцев, Д. М. Никулина. — 2-е изд., перераб. и доп. — М. : Издательство Юрайт, 2019. — 75 с. — (Серия : Профессиональное образование).

ISBN 978-5-534-06849-8

Учебное пособие представляет собой обобщенную информацию по строению, биологической функции, физико-химическим свойствам, структурной характеристике и клинико-диагностической роли гемоглобинов. Пособие разработано с учетом современных данных по освещаемым вопросам, интегрированным, систематизированным и адаптированным авторами для адекватного восприятия.

Пособие предназначено для студентов медицинских и биологических факультетов среднего профессионального образования. Авторы выражают надежду, что издание окажется полезным и научным сотрудникам, изучающим ассоциированные с тканевым дыханием белки, а также врачам-специалистам, работникам биохимических лабораторий лечебно-профилактических учреждений.

Иллюстрации к учебному пособию в цветном формате представлены в ЭБС ЮРАЙТ.

УДК 577.1(075.8)

ББК 28.072я73

Розыскиваем правообладателей: <https://www.biblio-online.ru/inform>

Пожалуйста, обратитесь в Отдел договорной работы: +7 (495) 744-00-12; e-mail: expert@urait.ru



Все права защищены. Никакая часть данной книги не может быть воспроизведена в какой бы то ни было форме без письменного разрешения владельцев авторских прав. Правовую поддержку издательства обеспечивает юридическая компания «Дельфи».

© Кривенцев Ю. А., Никулина Д. М., 2007

© Кривенцев Ю. А., Никулина Д. М., 2018, с изменениями

© ООО «Издательство Юрайт», 2019

ISBN 978-5-534-06849-8

Оглавление

Список сокращений	4
Предисловие	5
Введение	7
Глава 1. Биологическая роль и происхождение гемоглобинов	9
1.1. Место гемоглобинов в дыхательной функции организма	9
1.2. Клеточные основы гемического дыхания	11
1.2.1. Эритропоэз	11
1.2.2. Синтез гемоглобина в эритроидной клетке	16
1.2.3. Регуляция эритропоэза	17
Глава 2. Строение и свойства гемоглобинов	19
2.1. Строение гемоглобинов	19
2.1.1. Строение, биологическая роль и классификация гемов	19
2.1.2. Структурная организация глобина	23
2.2. Физико-химические свойства гемоглобина	28
2.2.1. Физико-химические свойства гема	28
2.2.2. Физико-химические свойства нативной молекулы гемоглобина	29
2.3. Свойства, определяющие транспортно-дыхательную функцию гемоглобина	30
2.3.1. Взаимодействие с кислородом	31
2.3.2. Транспорт CO ₂	33
Глава 3. Полиморфизм гемоглобинов	35
3.1. Номенклатура и классификация гемоглобинов	35
3.2. Характеристика основных типов гемоглобинов человека	39
3.2.1. Физиологические типы гемоглобинов	39
3.2.2. Патологические типы гемоглобинов	44
Глава 4. Эволюция генотипов гемоглобина	47
4.1. Эволюция генотипов гемоглобина как механизм адаптации к условиям существования	47

4.2. Динамика концентраций гемоглобинов в онтогенезе.....	50
4.2.1. Количественные изменения общего гемоглобина в онтогенезе	50
4.2.2. Качественная и количественная трансформация гемоглобинового профиля в процессе онтогенеза	52
Глава 5. Клинико-диагностическое значение количественных и качественных изменений гемоглобинового профиля.....	55
5.1. Общий гемоглобин крови	55
5.2. Изменение концентрации отдельных типов гемоглобина	56
5.3. Лабораторные методы определения гемоглобина	59
5.3.1. Качественное определение гемоглобина	59
5.3.2. Количественный анализ гемоглобина	60
Контрольные вопросы и тесты	63
Ответы к учебно-тестовым заданиям.....	68
Список литературы	69
Новые издания по дисциплине	73

Список сокращений

Å	Ангстрем
CNНb	Циангемоглобин
CO	Угарный газ
CO ₂	Углекислый газ
Hb	Гемоглобин
HbA ₁	Гемоглобин A ₁
HbA ₂	Гемоглобин A ₂
HbCN	Гемиглобинцианид
HbCO	Карбоксигемоглобин
HbF	Фетальный гемоглобин
HbE; HbP	Эмбриональный гемоглобин
HbS	Серповидноклеточный гемоглобин
MetHb	Метгемоглобин
NaN ₃ Hb	Азид-метгемоглобин
NaN ₃ MetHb	Азидметгемоглобин
(NH ₄) ₂ SO ₄	Сульфат аммония
pH	Водородный показатель
SHb	Сульфгемоглобин
ДФГК	Дифосфоглицериновая кислота
мРНК	Матричная рибонуклеиновая кислота
(н.у.)	Нормальные условия
ОЦК	Объем циркулирующей крови
РНК	Рибонуклеиновая кислота
СКА	Серповидноклеточная анемия
ЦПЭ	Цепь переноса электронов
УФ	Ультрафиолет
ХИБС	Хронические ишемические болезни сердца
ХОБЛ	Хронические обструктивные болезни легких
ЭПО	Эритропоэтин

Предисловие

Предлагаемое учебное пособие представляет законченное произведение, включающее: список сокращений, предисловие, введение, основной текст произведения, разбитый на пять последовательных глав, список литературы, контрольные вопросы и тесты, а также ответы к учебно-тестовым заданиям.

Издание представляет собой систематизированный композит классических данных по строению, биологической функции, физико-химическим свойствам, структурной характеристике и клинко-диагностической роли гемоглобинов, дополненных новейшими взглядами по освещаемым вопросам, интегрированным, систематизированным и адаптированным авторами для адекватного восприятия.

В первую очередь, книга создана для молодых ученых, интересующихся, в силу специфики своего образования, проблемами эритрона, гетерогенной системы гемоглобина и ее ключевой роли в адекватном обеспечении дыхания и аэробного метаболизма в самом широком смысле. Главные адресаты пособия: студенты биологических, медицинских и ветеринарных факультетов среднего профессионального образования, академический бакалавриат, аспиранты. Авторы выражают надежду, что издание окажется полезным и для научных сотрудников, изучающих ассоциированные с тканевым дыханием белки, а также врачам-специалистам, работникам биохимических лабораторий лечебно-профилактических учреждений.

В большинстве доступной учебной специальной литературы разделы, в которых представлена биохимия гемоглобинов, существенно разобщены по учебному плану во времени и в учебнике, а разрозненность материала по одному объекту изучения затрудняет формирование общего представления и использование его в дальнейшем. Кроме того, появляются все новые данные о клинко-диагностической роли гемоглобинов, несмотря на то, что они относятся к наиболее изученным белкам. Поэтому в пособии обобщены в доступном для понимания стиле и логической последовательности основные современные научные представления о гемоглобинах человека.

В результате изучения материалов данного учебника студент должен освоить:

трудовые действия

- владения навыками диагностики патологических состояний человека по изменению соотношений типов гемоглобина в крови;

- методами качественного определения и количественного анализа гемоглобина;

необходимые умения

- выделять типы порфиринов;
- классифицировать гемоглобины по их происхождению и значимости;

- определять патологические типы гемоглобинов;

необходимые знания

- биологической роли и происхождения гемоглобинов;
- строения и свойств гемоглобинов;
- классификации гемов;
- физико-химических свойств гемов и нативной молекулы гемоглобина;
- эволюции генотипов гемоглобина.

Введение

Современные представления об эволюции жизни на нашей планете свидетельствуют о том, что первые организмы, возникшие на планете и просуществовавшие миллиарды лет, были *облигатными анаэробами*. Это очевидно с учетом ничтожно малого присутствия кислорода в атмосфере Земли тех времен. Но зато первичный океан был богат примитивными органическими веществами, необходимыми для обеспечения жизнедеятельности именно этой группы организмов.

В дальнейшем произошло крупнейшее эволюционное событие — возникновение процесса фотосинтеза, знаменовавшее появление новой группы живого — *аутотрофов*. Только с этого момента эволюции существование жизни в глобальном масштабе стало независимым от наличия органического сырья в гидросфере. Так как аутотрофные организмы выделяют в процессе фотосинтеза большое количество кислорода, их размножение повлекло резкое изменение состава Земной атмосферы с накоплением огромных количеств O_2 (до 21%). И по сей день фотосинтетический процесс является единственным крупным источником кислорода на Земле.

Появление такого «удобного» окислителя, как кислород, дало организмам-потребителям прекрасную возможность более эффективного извлечения энергии органических веществ, что привело к эволюционному возникновению вначале *факультативных анаэробов*, а затем и *аэробных* организмов.

Преимуществом аэробного окисления является больший количественный энергетический выход на единицу массы органического субстрата. Например, при полном аэробном окислении одной молекулы глюкозы образуется 36—38 молекул АТФ, тогда как при анаэробном окислении одной молекулы глюкозы в процессе гликолиза синтезируется лишь 2 молекулы АТФ. Эффективность аэробного энергетического катаболизма определяет эволюционную прогрессивность организмов, использующих дыхание.

Формирование многоклеточных организмов неизбежно привело к возникновению проблемы доставки атмосферного

кислорода во все структуры и клетки биологических систем. Появление гуморальных мессенджеров, транспортирующих дыхательные газы, представляется очевидным решением этой проблемы.

В ходе эволюции у позвоночных выработалось два основных механизма, обеспечивающих снабжение клеток постоянным и достаточным количеством кислорода. Первый — это система кровообращения, которая активно поставляет клеткам кислород. Второе важнейшее приспособление для снабжения клеток кислородом, позволившее преодолеть ограничения, обусловленные низкой растворимостью кислорода в воде, — это появление в процессе эволюции специальных молекул — переносчиков кислорода.

У позвоночных такими молекулами служат белки гемоглобин и миоглобин. Оба белка имеют общее эволюционное происхождение, похожую конформацию полипептидных цепей и, соответственно, аналогичную функцию: гемоглобин, содержащийся в эритроцитах, играет роль переносчика кислорода кровью, а миоглобин, находящийся в мышцах, выполняет функцию резервного источника кислорода и облегчает транспорт кислорода в мышцах.

Присутствие гемоглобина в 50 раз увеличивает способность крови переносить кислород. Кроме того, он играет жизненно важную роль в транспорте углекислого газа и ионов водорода.

Однако миоглобин и гемоглобин отличаются уровнем конечной структуры: миоглобин имеет только третичную структуру (является мономером), а гемоглобин — четвертичную (является тетрамером). Наличие высшей структуры у гемоглобина придает этому белку свойства, отсутствующие у миоглобина, в первую очередь, возможность регуляции его функции.

Кровь ежедневно переносит из легких в ткани около 600 л O_2 . Из-за плохой растворимости в воде практически весь кислород связан с гемоглобином эритроцитов. Количество получаемого тканями кислорода зависит от способности гемоглобина отдавать его в капиллярах тканей. С учетом того, что кислород является сильным окислителем и избыток его поступления в ткани может привести к повреждению структуры и функции молекул клетки, способность гемоглобина регулировать сродство к O_2 в зависимости от тканевых условий является его важнейшей характеристикой.

Глава 1

БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ И ПРОИСХОЖДЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНОВ

1.1. Место гемоглобинов в дыхательной функции организма

Кислород является одним из самых слабо растворимых в воде газов: его растворимость (н.у.) — 4,9 мл в 100 мл воды (для сравнения, растворимость Cl_2 — 461 мл/100 мл воды, растворимость CO_2 — 171 мл/100 мл). Поэтому лишь ничтожная доля кислорода может транспортироваться плазмой крови в свободном виде. Аналогичным образом углекислый газ не может транспортироваться с достаточной скоростью от тканей к легким в простом растворе. Следовательно, многоклеточным аэробным и факультативно-анаэробным организмам необходим транспортный гуморальный механизм, способный селективно и обратимо связывать дыхательные газы. У большинства высших животных эту функцию выполняет система дыхательных пигментов. В настоящее время известны четыре дыхательных пигмента, встречающихся в организме современных животных: *гемоглобин*, *гемоцианин*, *хлорокруорин* и *гемэритрин*. Из них только гемоцианин содержит медь, в состав остальных входит железо. Близко родственными по структуре являются гемоглобин и хлорокруорин.

Главная особенность дыхательных белков, и гемоглобинов в том числе, заключается в обратимом присоединении кислорода, связывании его при атмосферном давлении и освобождении в условиях недостатка.

Гемоглобин (от греч. *haemo* — кровь и лат. *globus* — шар) — красный железосодержащий пигмент, он же основной дыхательный пигмент крови человека, позвоночных и некоторых беспозвоночных животных. Относится к сложным белкам — хромопротеидам.

Гемоглобин (Hb) был первым белком животного происхождения, который удалось получить в кристаллическом виде (Hunefeld, 1889). Этот белок широко распространен среди всех эукариотических организмов — от примитивных одноклеточных (дрожжей) до высших позвоночных. Причем, Hb является первичным акцептором кислорода в отличие, например, от миоглобина. Его количество, содержащееся в 100 мл крови, связывает около 20 мл газообразного кислорода. Гемоглобин часто называют дыхательным ферментом. По определению М. Perutz, он — «молекулярное легкое», хотя сродство гемоглобина к кислороду невысоко. Существуют лиганды, по отношению к которым Hb обладает значительно большей тропностью: к ним относятся CO и NO. И если взаимодействие Hb с NO представляет лишь теоретический интерес, то ассоциация Hb-CO имеет большое физиологическое значение.

У многих беспозвоночных гемоглобин свободно растворен в крови. У позвоночных и некоторых беспозвоночных животных Hb находится в красных кровяных клетках — эритроцитах. Эти клетки образуют важнейшую ткань тела человека, их общий вес почти равен весу печени.

Эритроциты — очень мелкие псевдоклеточные структуры. Их нельзя назвать клетками в полном смысле, так как они лишены ядра, митохондрий и других органелл.

Примечательно, что в собственном метаболизме эритроцита кислород не используется (АТФ синтезируется анаэробно). Hb — самый главный белок эритроцитов, составляющий 35% от его общей массы. В одном эритроците среднего размера (7 мкм) содержится 15—20 мкг гемоглобина. В раннем возрасте, когда клетки очень крупные, содержание гемоглобина у человека может достигать 60 мкг и более. Подсчитано, что в одном эритроците содержится около ~ 340 000 000 молекул гемоглобина, каждая из которых состоит примерно из 10^3 атомов.

В организме Hb выполняет следующие биологические функции:

1. Транспортно-дыхательную:

— перенос кислорода (O_2) из легких к периферическим тканям;

— перенос углекислого газа (CO_2) и катионов водорода от периферических тканей к дыхательным органам для последующего выведения из организма.

2. Буферную в поддержании кислотно-основного равновесия крови. Буферная система, создаваемая Hb, способствует сохранению pH крови в определенных пределах: гемоглибиновый буфер является самым мощным буфером крови ($\approx 75\%$ от общей буферной емкости крови).

Гемоглобин можно считать своего рода модельным белком, структура, свойства и функции которого наиболее полно изучены по сравнению с другими белками на протяжении последних 50 лет. Длительный период исследований гемоглобина во многих лабораториях мира привел к значительному прогрессу в понимании и описании физических, химических и биологических аспектов его функционирования. Американский физик Norfield назвал Hb атомом водорода современной биохимии, имея в виду, что изучение гемоглобина сыграло в биохимии ту же роль, что и изучение атома водорода в физике. Гемоглобин называют также почетным ферментом, поскольку исследования его структуры в статике и динамике позволили значительно продвинуться в понимании механизмов функционирования ферментов.

1.2. Клеточные основы гемического дыхания

1.2.1. Эритропоэз

Эритрон — сложная клеточная система, выполняющая высокоспециализированную функцию транспорта O_2 из альвеолярного воздуха в ткани.

Система эритрона включает в себя следующие категории клеток:

- ядродержащие эритроидные клетки костного мозга;
- ретикулоциты костного мозга;
- ретикулоциты крови;
- зрелые эритроциты.

Важнейшая роль в обновлении клеточных структур эритрона принадлежит тканям красного костного мозга. Эритроидный росток костного мозга поддерживает на постоянном уровне популяцию в $25 \cdot 10^{12}$ циркулирующих эритроцитов, которые содержат 750 г гемоглобина. Тем не менее в костном мозге находится лишь 6% клеток эритрона, а 94% — в циркулирующей крови.

Первые примитивные клетки эритропоэза обнаруживаются в желточном мешке уже в конце второй недели развития эмбриона. Кроветворение начинается в желточном мешке из клеток мезенхимы одновременно с развитием сосудов (ангиобластический период). Мезенхимные клетки преобразуются в первичные клетки крови.

Первичные *гемогистиобласты* являются крупными округлыми клетками с базофильной цитоплазмой и хорошо заметными глыбками хроматина в ядре. Эти клетки усиленно пролиферируют и превращаются в *мегалобласты* (первичные эритробласты). Незначительная часть гемогистиобластов остается в недифференцированном состоянии и дает в дальнейшем начало *стволовым клеткам-предшественникам* (гемоцитобластам) — родоначальным элементам всех последующих клеток крови (рис. 1.1). Из этих клеток еще в сосудах желточного мешка развиваются вторичные эритробласты.

На 4—5-й неделе происходит атрофия желточного мешка и местом образования кровяных клеток становятся печень, костный мозг и лимфатические узлы. Печень у эмбриона закладывается на 3—4-й неделе путем врастания железистого эпителия двенадцатиперстной кишки в мезенхимную ткань. Примерно к 5-й неделе развития в печени начинается образование клеток крови. Эмбриональная печень, по-видимому, является местом «чистого» эритропоэза и в период от 3 до 4 мес. внутриутробного развития эритроидные предшественники составляют приблизительно 50% всех ядросодержащих клеток этого органа. Печень — главный орган эритропоэза от 3 до 6 мес. внутриутробного развития, продолжает вырабатывать эритроциты в первую неделю после рождения. Источником кроветворения в печени являются ретикулоциты мезенхимы, из которых дифференцируются гемогистиобласты, образующие мегалобласты.

Миелоидный гемопоэз начинается к 12-й неделе внутриутробного развития, когда происходит закладка красного костного мозга и селезенки, активно участвующих в кроветворении. Во время последнего триместра внутриутробного развития костный мозг является главным местом образования клеток крови. Количество костномозговых клеток становится максимальным примерно к 30 неделям внутриутробного развития, хотя объем костномозговой ткани продолжает увеличиваться до разрешения беременности.

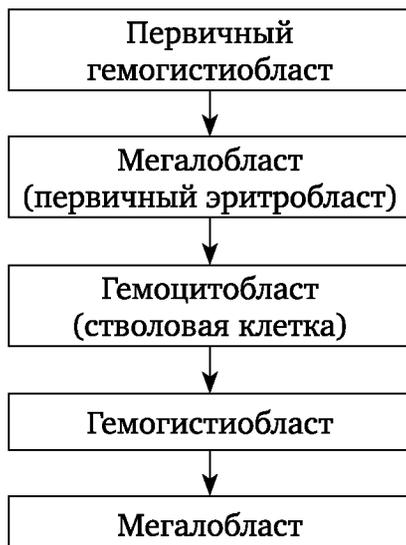


Рис. 1.1. Схема клеточной дифференцировки раннего эритропоэза

К концу внутриутробного периода кроветворение в печени прекращается и красный костный мозг остается единственным органом, где происходит эритро- и миелопоэз на протяжении всей последующей жизни (табл. 1.1).

Таблица 1.1

Стадии эритропоэза

Этап эритропоэза	Эритропоэтические ткани	Период онтогенеза
Ангиобластический	Желточный мешок	До 4—5-й недели внутриутробного развития
	Печень, красный костный мозг, лимфатические узлы	С 4—5 до 12-й недели внутриутробного развития
Миелоидный	Печень, селезенка, лимфатические узлы	С 12-й недели внутриутробного развития до родов
	Красный костный мозг	С 12-й недели внутриутробного развития до смерти

Если на ранних стадиях эмбрионального развития (до 12 недель) преобладают первичные эритробласты, то к 20—25-й неделе содержание нормобластов значительно возрастает. Нормобла-

стический эритропоэз начинается приблизительно с 6-й недели гестации и к 10-й неделе он составляет уже более 90% всех эритроидных клеток.

На 5-м месяце внутриутробного развития в связи с накоплением в печени плода гемопоэтических веществ, поступающих из материнского организма, мегалобластическое кроветворение окончательно сменяется нормобластическим. Этот тип эритропоэза является единственным физиологическим типом кроветворения в постнатальном периоде.

Основными клетками, участвующими в нормобластических эритропоэтических процессах, являются пронормобласты, нормобласты и нормоциты. Предшественником этого типа кроветворения являются проэритробласты.

Проэритробласт, составляющий краеугольный камень в эритропоэзе, запрограммирован как для пролиферации, так и для синтеза, упаковки и защиты молекул гемоглобина. Из одного проэритробласта, имеющего объем около 900 мкм^3 , путем последовательной трансформации образуются 8—16 эритроцитов, содержащих до $400 \cdot 10^9$ молекул гемоглобина в каждой клетке объемом примерно 90 мкм^3 . Это большая клетка диаметром 20—25 мкм с круглым ядром, занимающим $3/4$ клетки и базофильной цитоплазмой. Проэритробласты в течение 3—5 суток подвергаются дальнейшей дифференциации (созреванию) и последовательным 3—4 митотическим делениям, проходя через морфологически типичные стадии (базофильные и полихроматофильные клетки), превращаются в пронормоциты и затем в нормоциты.

Проэритробласт после деления теряет свои ядрышки и дает два базофильных *пронормобласта* (эритробласта) (диаметром 12—18 мкм) с интенсивно базофильной цитоплазмой и более конденсированным ядром (рис. 1.2).

Из базофильных пронормобластов в результате деления образуются полихроматофильные пронормобласты, в которых отчетливо накапливается гемоглобин. Полихроматофильные пронормобласты подвергаются последнему делению и превращаются в неделящиеся полихроматофильные нормобласты, созревающие в оксифильные (ортохромные) *нормоциты*.

Нормоцит — последняя стадия развития ядерной красной клетки, размеры 8—12 мкм. Нормоциты делят на базофильные, полихроматофильные и оксифильные. На определенной стадии развития ядро нормоцитов, имеющее вначале радиальную структуру, становится плотным, пикнотическим и выталкивается путем внутриклеточной демаркации и внеклеточного давления.

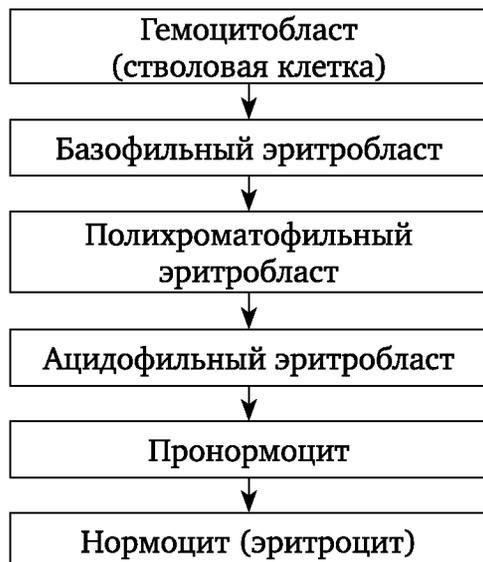


Рис. 1.2 Схема клеточной дифференцировки позднего эритропоэза

Таким образом, нормобласт превращается в нормоцит, т.е. типичный зрелый эритроцит.

Только что поступившие в общий кровоток нормоциты называют ретикулоцитами. Их название (*reticulum* — сеть) объясняется базофильной сеточкой, выявляющейся в эндоплазме при окраске бриллиантовокрезильной синей. Период созревания от проэритробласта до ретикулоцита составляет примерно 120 ч, в среднем 24 ч на каждую стадию развития. Созревание ретикулоцитов начинается в костном мозге и заканчивается в циркулирующей крови и в селезенке, которая нормально секвестрирует некоторое количество незрелых ретикулоцитов.

Поскольку гемоглобин в эритроците не обновляется, а находится в клетке вплоть до ее гибели, следует отметить, что он становится преобладающей частью клеточных белков (95% сухой массы эритроцита).

В ретикулоцитах продолжается синтез гемоглобина еще в течение 3—4 суток (см. подпараграф 1.2.2.). В процессе созревания ретикулоцитов происходит дезагрегация полирибосом на отдельные рибосомы. Постепенно клетка освобождается от рибосом, утрачивает митохондрии, места связывания с трансферрином, и синтез гемоглобина прекращается.

Кроме способности синтезировать гем и глобин, ретикулоциты сохраняют биохимические свойства полноценных клеток, а именно: функционирующий цикл Кребса, процессы аэробного и анаэробного окисления, тканевое дыхание.

По мере старения эритроцит становится более плотным, но сохраняет свою гибкость и двояковогнутую форму при сохранении метаболических путей, ответственных за поддержание структуры и функций клетки на достаточно эффективном уровне. Снижение этого уровня, обусловленное постепенной утратой ферментов, которые вновь не синтезируются, приводит к ригидности эритроцитов, захвату их фагоцитирующими макрофагами и деструкции.

1.2.2. Синтез гемоглобина в эритроидной клетке

Гемоглобин синтезируется главным образом в ретикулоцитах. Синтез молекулы гемоглобина состоит из синтеза гема и синтеза глобина. Синтез гема наиболее интенсивен на стадии позднего эритробласта.

Исходными веществами этого процесса являются аминокислота глицин и сукцинил-коэнзим А (рис. 1.3). Глицин служит источником всех атомов азота пиррольных колец, а также части углеродных атомов. Остальные атомы углерода гема принадлежат сукцинильному остатку (в синтезе одной молекулы гема участвуют 8 молекул сукцинил-коэнзима А).

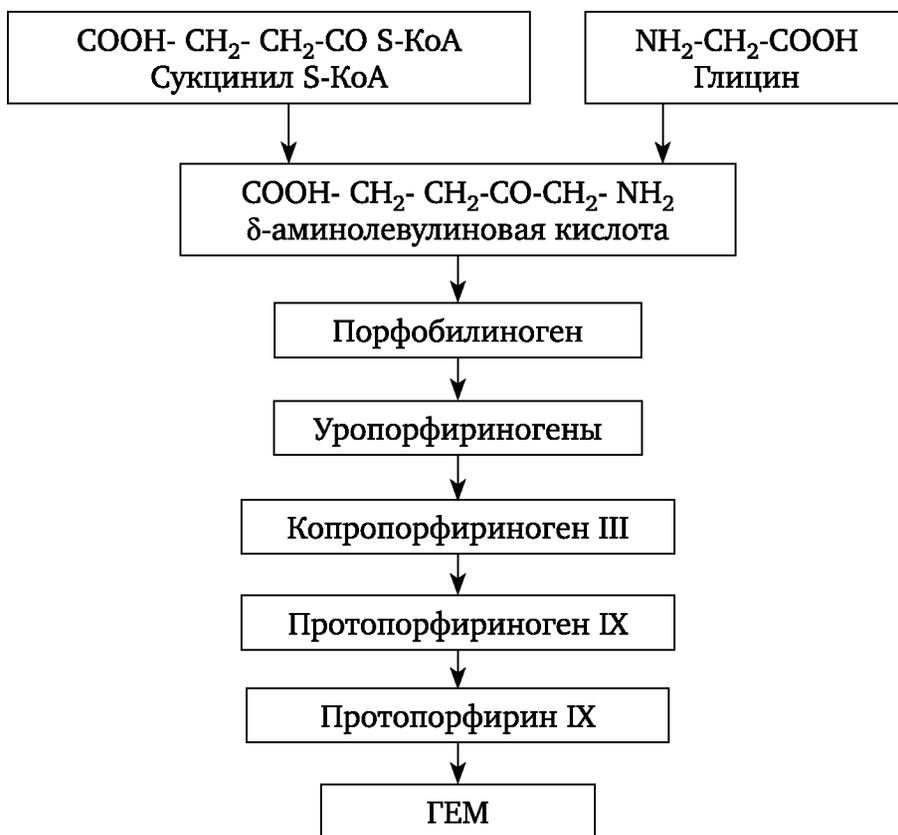


Рис. 1.3. Синтез гема

Синтез протопорфирина происходит в митохондриях. Туда же из плазмы поступает железо, переносчиком которого является белок трансферрин.

Образующийся гем, в свою очередь, инициирует трансляцию глобиновой матричной РНК, способствует агрегации функционирующих рибосом и ускоряет движение рибосом вдоль молекулы мРНК. Синтез белковых цепей глобина происходит в активных полирибосомах, состоящих из пяти рибосом, соединенных вместе стабильной глобиновой мРНК.

Синтез глобина начинается с первых стадий клеточной дифференцировки эритроидных клеток и, постепенно убывая, продолжается в процессе созревания эритроцита. Синтезированный гем выходит из митохондрий в цитоплазму, где соединяется с глобином, синтезированным на полирибосомах. Четыре образованных таким образом Сведберговых единицы ассоциируются в гемоглобин-тетрамер (рис. 1.4).

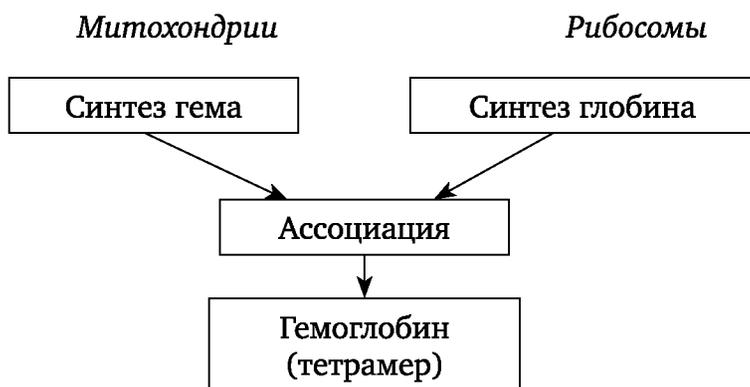


Рис. 1.4. Схема синтеза гемоглобина

1.2.3. Регуляция эритропоэза

Главным гуморальным регулятором эритропоэза является почечный гормон эритропоэтин. Еще в 1950 г. Reissmann представил косвенные данные в пользу эритропоэтического гормона, и в 1953 г. Erslev прямо продемонстрировал его присутствие в плазме крови анемичных животных. На клеточном уровне этот гормон оказывает два главных эффекта:

1) стимуляцию пролиферации и созревания ранних и промежуточных эритропоэтинчувствительных клеток в отделе эритроидных предшественников;

2) индукцию терминальной дифференциации поздних эритропоэтинчувствительных клеток в проэритробласты.

Кроме названных ключевых действий эритропоэтин способен инициировать дополнительные эффекты, играющие определенную роль в условиях эритропоэтического стресса, а именно:

укорочение интермитотического периода, т.е. повышение количества митозов за единицу времени у делящихся клеток эритрона;

- ускорение созревания неделящихся клеток эритрона (нормоцитов и костномозговых ретикулоцитов);
- исключение одного или нескольких промежуточных обязательных митотических делений («перескоки» делений);
- уменьшение величины «неэффективного» эритропоэза, т.е. процента гибели эритроидных клеток в костном мозге.

Эритропоэтинчувствительные клетки находятся в состоянии широкого выбора возможности преимущественного (эвригенного) синтеза гемоглобина определенного типа. Стволовая клетка постепенно приобретает рецепторы для гуморальных факторов типа эритропоэтина и вступает в дальнейшую дифференцировку. В ходе дифференцировки популяция эритропоэтинчувствительных клеток становится способной к накоплению одного из типов гемоглобина, что, в первую очередь, связано с количеством делений, совершенных эритробластами. Такой переход осуществляется на уровне унипотентных предшественников эритроцитов.

По мере увеличения количества эритропоэтина в крови эритробласты образуются и из более ранних предшественников, интенсивнее формируется популяция с ускоренной дифференцировкой и, следовательно, повышается содержание эритроидных клеток, синтезирующих гемоглобин.

Глава 2

СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА ГЕМОГЛОБИНОВ

2.1. Строение гемоглобинов

Гемоглобины представляют собой мультимерные белки. Основные типы гемоглобина (см. гл. 3) имеют значительное структурное сходство: все они — тетрамеры, состоящие из двух пар: пары идентичных субъединиц, представленных α -цепями, и характерной для каждого типа другой парой β -, γ -, δ - или ϵ -цепей. Причем, отличия в аминокислотной последовательности β -, γ -, δ - и ϵ -цепей от α -цепи незначительны, что объясняет сходство высших структур (пространственные конформации этих полипептидов во многом аналогичны) и многих физико-химических свойств гемоглобинов. Известны типы гемоглобина, построенные из четырех идентичных протомеров.

Комплекс, составленный из одного гема и одной полипептидной глобиновой цепи, называется *Сведберговой единицей*. Следовательно, молекула гемоглобина состоит из четырех Сведберговских единиц. Молекулярная масса гемоглобина A_1 равна 64 458 Д, следовательно, на одну Сведбергову единицу полагается по 16 115 Д.

В свою очередь каждый из четырех протомеров представлен двумя частями: а) небелковая планарная часть — гем; б) белковая олигомерная глобула.

2.1.1. Строение, биологическая роль и классификация гемов

По химическому строению гем относится к группе порфиринов.

Под названием *порфирины* объединяют семейство молекул, центральным фрагментом которых является *порфин* — четыре пиррольных кольца, связанных между собой метено-

выми мостиками и образующих ароматическое ядро, имеющее 26-электронную систему π -сопряжения.

В зависимости от структуры и положения заместителей у порфина различают несколько типов порфиринов: протопорфирины, этиопорфирины, мезопорфирины, копропорфирины. Характерным свойством порфиринов является их способность образовывать комплексы с ионами металлов, связывающимися с атомами азота пиррольных колец. Примерами служат железо-порфирины, в частности гем, и магнийсодержащий порфирин хлорофилл — пигмент растений, участвующий в фотосинтезе.

Все многообразие порфиринов обеспечивается различием в положении и строении боковых радикалов. Возможны 15 вариантов расположения боковых цепей, но в составе гемопротеинов присутствует только один изомер, называемый протопорфирин IX (рис. 2.1).

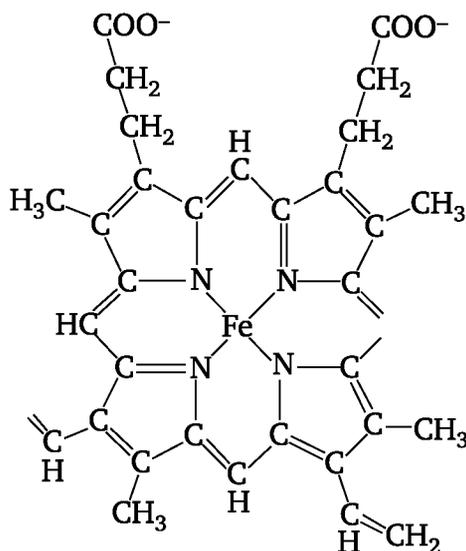


Рис. 2.1. Гем (Fe-)

В молекуле протопорфирина IX порфиновое ядро содержит четыре метильные группы (в положениях 1, 3, 5, 8), две винильные группы (в положениях 2 и 4) и две пропионильные боковые цепи (в положениях 6 и 7). В центре тетрапиррольной ароматической системы гема обязательно содержится ион железа.

Гем (протогем) — тетрапиррольная ароматическая структура протопорфирина IX, в состав которого обязательно входит ион Fe²⁺. SP₂-гибридные атомы C и N π -электронной системы порфиринового лиганда обеспечивают его плоскостную структуру (см. рис. 2.1, 2.2).

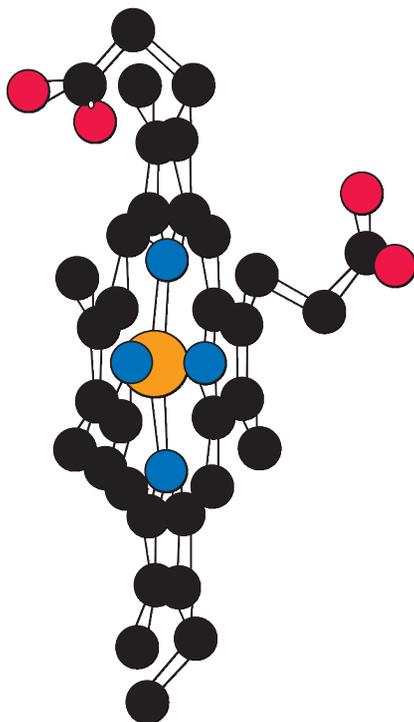


Рис. 2.2. Гем гемоглобина (по Л. Страйеру)

Тем не менее кристаллографические исследования свидетельствуют, что порфириновый остов деформируется и образует «куполообразные» или «гофрированные структуры».

Биологическая роль гема. Гем — *простетическая группа* железосодержащих белков (гемоглобина, миоглобина, цитохромов, пероксидазы, каталазы и др.). Именно гем обеспечивает этим белкам их главные функции: связывание (миоглобин и гемоглобин) и транспорт кислорода (гемоглобин), участие в цепи переноса электронов (цитохромы), восстановление кислорода до воды (цитохромоксидаза), микросомальное окисление (цитохром P₄₅₀), разложение перекисей (каталаза и пероксидаза).

Этимология приставок *геми-* и *гемо-* связана с названиями железопорфириновых группировок: комплекс порфирина с двухвалентным железом называют *гемом*, а порфириновый комплекс с Fe трехвалентным — *гемин*ом.

Классификация. Выделяют множество типов гемов, различающихся структурой порфиринового ядра, наиболее распространенными из которых являются гемы типов: *a*, *b*, *c*. Эти типы подразделяются на подтипы, которые, как правило, обозначаются теми же буквами с цифровыми индексами.

Первым и наиболее хорошо изученным гемом был гем *b*. Протопорфирин IX является его ароматическим планарным

лигандом. Поэтому гем **b** часто называют Fe^{2+} протопорфирином, протогемом или просто гемом. Молекулярный состав гема: $C_{34}H_{32}O_4N_4Fe$ с ионом Fe^{2+} в центре.

Гемы типов **a** и **c** имеет почти ту же структуру, что и гем **b**, лишь с некоторыми незначительными отличиями в строении и положении некоторых боковых заместителей, или в формировании некоторых связей. Гем **a** отличается от гема **b** тем, что во втором положении у гема **a** вместо винильной группы находится 1-окси-2-этильная группа, а в положении 8 вместо метильной группы — формильная группа. В геме **c** остатки цистеина связаны тиоэфирными связями с C-1/-атомами этильных групп во 2 и 4 положениях порфиринового блока.

В биологических системах все типы гемов связаны с белками и могут присутствовать в биологических средах в свободном состоянии только в минорных количествах. В качестве примера могут служить гемовые группы *цитохромов* дыхательной цепи, относящихся к группе гемопротейдов.

Цитохромы, за исключением цитохромоксидазы, классифицируются как анаэробные дегидрогеназы. Их идентификация и изучение облегчается тем обстоятельством, что в восстановленном состоянии они имеют характерные полосы в спектре поглощения, которые исчезают при окислении. В дыхательной цепи они служат переносчиками электронов от убинона к цитохромоксидазе. Цитохромы являются железосодержащими гемопротейнами, у которых атом железа переходит из состояния Fe^{2+} в Fe^{3+} и обратно в процессе окисления и восстановления.

В состав дыхательной цепи входят цитохромы **b**, **c1**, **c**, **aa₃** или цитохромоксидаза. Из них растворимым является только цитохром **c**. Помимо дыхательной цепи цитохромы имеются в эндоплазматическом ретикулуме (цитохром P-450), в растительных клетках, бактериях и дрожжах.

Названия цитохромов дыхательной цепи сформированы в зависимости от типа гема, входящего в их молекулу (цитохромы **c** и **c1**, **a** и **a₃**). Анализ строения цитохромоксидазы (цитохром **aa₃**) показывает, что белок является мультимером, в состав которого входят 2 глобулы цитохрома **a** и 4 глобулы цитохрома **a₃**. Каждый из шести протомеров этого белка имеет по одной протетической группе гема **a**. Методом ультрафиолетово-спектрального анализа доказана идентичность всех шести групп гема цитохромоксидазы.

Типичным цитохромом по структуре и физико-химическим свойствам является цитохром **c**. Это первый и наиболее полно

изученный белок группы цитохромов. Цитохромами с называются такие цитохромы, у которых гем связан с белком ковалентно через боковую цепь порфирина.

Цитохромы с из эукариот обладают следующими свойствами:

- 1) молекулярной массой, близкой к 12 000 Д;
- 2) наличие одного гема на молекулу;
- 3) величиной $E_{v,7}$, близкой 0,25 В;
- 4) изоэлектрической точкой при рН 10;
- 5) высокой скоростью реакции с препаратами цитохромоксидазы из тканей млекопитающих.

2.1.2. Структурная организация глобина

Белковый компонент гемоглобина — *глобин*, принадлежит к группе гистонов. Вспомним, что гистонами по принятой классификации называют белки, богатые основными аминокислотами и, следовательно, имеющими основной характер, а белковая часть Hb характеризуется очень высоким содержанием остатков основной кислоты гистидина.

Число аминокислотных остатков в полипептидной цепи разных типов гемоглобина колеблется в диапазоне от 140 до 150, причем чаще встречаются числа 141, 146, 153. В состав протомеров гемоглобина человека входит либо 141 (α -цепь), либо 146 (β -, γ -, δ -цепи) аминокислотных остатков.

Первичная структура. Свойства индивидуальных гемоглобинов, как и всех других глобулярных мультимерных протеинов, неразрывно связаны с их высшими структурами: четвертичной и третичной. Конфигурация высших структур полностью определяется *первичной структурой*, т.е. уникальной линейной комбинацией аминокислотных остатков, связанных амидными или пептидными связями (рис. 2.3).

Полипептидные α -цепи гемоглобина при неполном гидролизе дают продукты распада с концевой группой валил-лейцин, а β -цепи дают продукты распада с концевой группой валил-гистидил-лейцин.

Первичная структура каждого из протомеров HbA₁ представлена аминокислотной последовательностью числом около полутора сотен в зависимости от типа протомера. В оксиформе гемоглобина С-концевые остатки свободны во всех цепях. Это аргинин в 141-м положении в α -цепи и гистидин в 146-м положении в β -цепи. Предпоследней аминокислотой во всех цепях является тирозин.

Вал-Гис-Лей-Тре--Про-Глу- Гл у-Лиз-Сер-Ала-Вал-Тре-Ала -Лей-Три-Гли-
 Лиз -Ва -Асн-В ал-Асп-Глу-Вал-Гли-Гли-Глу-Ала-Лей-Гли-Арг-Лей-Лей-Вал-
 Вал-Тир-Про-Три-Тре-Глн-Арг-Фен-Фен -Глу-Сер-Фен -Гли-Асп -Лей-Сер-
 Тре-Про- Асп-Ала-Вал -Мет-Гли -Асн-Про-Лиз-Вал-Лиз-Ал а-Гис-Гли-Лиз-
 Лиз-В ал-Лей-Гли-Ала -Фен-Сер-Асп-Гли-Лей-Ала -Гис-Лей-Асп -Асп -Лей-
 Лиз-Гли-Тре-Фен-Ала-Тре-Лей-Сер-Глу-Лей-Гис-Цис-Асп-Лиз-Лей-Гис-Вал-
 Асп-Про-Глу-Асн-Фен-Арг-Лей-Лей-Гли-Асн -Вал -Лей-Вал-Цис-Вал-Лей-
 Ала-Гис-Гис-Фен-Гли-Лиз-Глу-Фен-Тре-Про-Про-Вал-Глн-Ала-Ала-Тир-Глн-
 Лиз-Вал-Вал-Ала-Гли-Вал-Ала-Асн-Ала-Лей-Ала-Гис-Лиз-Тир-Гис

Рис. 2.3. Последовательность первичной структуры гемоглобина на примере его β -цепи

Вторичная и третичная структуры. Вторичная структура гемоглобинов представлена α -спиралью. Полипептидные цепи в гемоглобиновой молекуле более чем на 70% представлены скрученными в α -геликсовые спирали, фрагменты которых разделены участками, образующими изгибы вторичной цепи. Участки α -спирали прерываются деспирализованными фрагментами, обеспечивающими гибкость молекулы в процессе ее фолдинга. В результате такой укладки образуются третичные глобулы овоидной формы.

Число спирализованных участков различно у разных цепей Нв: α -цепь имеет 7 таких доменов, β -цепь — 8. Спирализованные фрагменты гемоглобина обозначают латинскими буквами, начиная с N-конца полипептидной цепи (например, в α -субъединице: А, В, С, D, E, F, H) (рис. 2.4).

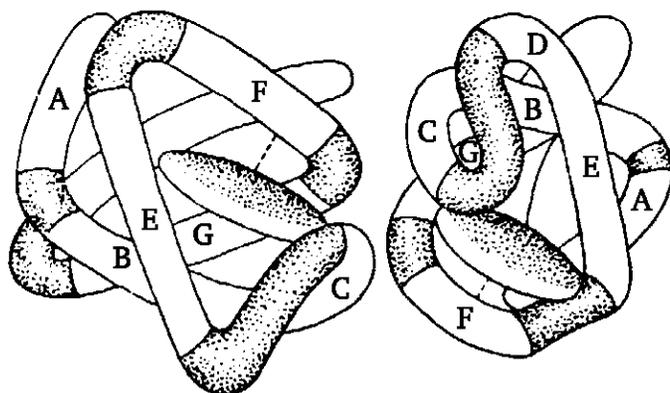


Рис. 2.4. Глобулярная структура двух полипептидных цепей гемоглобина (по И. Тодорову)

Число аминокислотных остатков в спирализованных и деспирализованных участках различно (табл. 2.1).

Таблица 2.1

Распределение аминокислотных остатков по сегментам протомеров гемоглобина

Сегмент		Порядковый номер остатка		Число остатков в сегменте
Спиральный	Деспирализованный	α -цепь	β -цепь	
A	пре-A	1-2	1-3	16
		3-18	4-19	
B	AB	19	–	16
	BC	20-35	20-34	
C	CD	–	–	7
		36-42	35-41	
D	DE	43-51	42-49	7
		–	50-56	
E	EF	–	–	20
		52-71	57-76	
F	FG	72-79	77-84	9
		80-88	85-93	
G	GH	89-93	94-98	19
		94-112	99-117	
H	пост-H	113-118	118-123	24
		119-141	124-146	
		–	–	

Несмотря на незначительные различия в аминокислотной последовательности миоглобина и β -полипептидов, они имеют почти идентичную вторичную и третичную структуры. Это поразительное сходство, которое распространяется на расположение гема и восьми спиральных участков, частично обусловлено тем, что в эквивалентных положениях первичной структуры миоглобина и β -субъединицы HbA находятся, хотя и различающиеся, но сходные по своим свойствам аминокислотные остатки.

Пространственная компоновка третичной структуры субъединиц гемоглобина соответствует принципам третичной укладки большинства глобулярных белков:

- *максимальная компактность* и соответственно минимальная площадь поверхности, обеспечивающая минимум свободной энергии: третичная структура гемоглобина — компактная белковая глобула, внутри которой практически нет свободного места;

- гидрофобные аминокислотные радикалы у Hb, так же как и у миоглобина, расположены внутри глобулы, за исключением двух остатков гистидина (Гис E₇ и Гис F₈), располагающихся в активном центре;

- большинство гидрофильных аминокислотных остатков располагаются на поверхности протомера.

Кооперация гема и глобина. В состав порфиринового ядра гема входит ион Fe²⁺. Именно ион Fe²⁺, а не Fe³⁺, может связываться с кислородом. Свободные ионы Fe²⁺ спонтанно окисляются до Fe³⁺, поэтому неорганическое железо не может быть хорошим переносчиком кислорода. Это связано с неспособностью Fe³⁺ в противоположность Fe²⁺ легко подавать электроны с t_{2g}-орбиталей на орбитали кислорода. Fe²⁺ в составе гема без глобина может связывать кислород, быстро окисляясь, образуя гематин. Поэтому, а также в силу плохой растворимости в воде свободный гем тоже не способен к транспорту кислорода.

Окисление железа гема происходит в том случае, если две молекулы гема взаимодействуют с молекулой кислорода. Связывание гема с белком (глобином) в молекуле гемоглобина предотвращает такое взаимодействие и сохраняет железо в двухвалентной форме.

Каждое из четырех ядер гема расположено в форме дисков диаметром 1,5 нм и высотой 0,37 нм, частично погруженных в своеобразные «карманы» белковых глобул между сегментами E и F, выстланные гидрофобными аминокислотными радикалами, в которых размещены молекулы гема.

Каждое ядро гема связано вандерваальсовыми связями числом примерно 60—75 с 30 атомами различных участков структуры глобина из 16 аминокислотных остатков. Почти все эти связи неполярны. Полярными являются только три связи: одна — в α-цепи и две — в β-цепи гемоглобина (связи остатков пропионовой кислоты гема с белком).

Четыре плоских ядра ориентированы таким образом, что одним краем каждый гем обращен к внутренней части молекулы, а другим — наружу, в сторону водно-солевой среды. Полярные цепи пропионовой кислоты гема находятся на поверхности молекулы, остальная часть гема погружена в глобулу.

Четвертичная структура Hb. Четвертичная структура наделяет гемоглобин дополнительными важными особенностями,

отсутствующими у миоглобина, которые способствуют выполнению гемоглобином его уникальной биологической функции и обеспечивают возможность строгой регуляции его свойств. Гемоглобин, как большинство белков с четвертичной структурой, обладает аллостерическими свойствами, т.е. его протомеры имеют аллостерические (регуляторные) центры.

Физиологической формой четвертичной структуры гемоглобинов человека является тетрамерная. Все четыре протомера гемоглобина располагаются пространственно в определенном соотношении — «кватернерная структура», образуя друг по отношению к другу тетраэдрическую конфигурацию.

Тетрамер гемоглобина — сфероид длиной 6,4 нм, шириной 5,5 нм и высотой 5,0 нм. Одна пара идентичных протомеров (α_1 — α_2) расположена параллельно друг другу двумя уплощенными овоидами. Другая пара (β_1 — β_2) расположена подобно паре α_1 — α_2 , но перпендикулярно ей. Молекула гемоглобина обладает осью симметрии второго порядка.

Так как поверхность протомеров неровная, полипептидные цепи в центральной области не могут плотно прилегать друг к другу. В результате в мультимерном состоянии гемоглобина четыре Сведберговских единицы формируют «центральную полость», проходящую сквозь всю молекулу Hb по ее высоте на 5,0 нм (рис. 2.5).

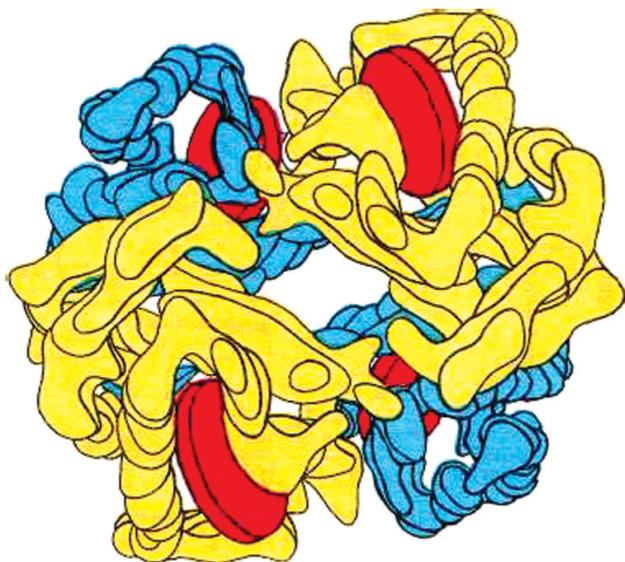


Рис. 2.5. Модель гемоглобина при низком разрешении α -цепи показаны светлым, β -цепи — темным, гем-дискоидами (по Л. Страйеру)

Полость эта выстлана множеством гидрофобных радикалов аминокислотных остатков: гли, ала, вал, лей, иле, фен, про, мет, три. Благодаря такому расположению неполярных групп между ними образуются гидрофобные взаимодействия, создающие выигрыш свободной энергии до 1,5 кКал/Моль и тем самым стабилизирующие тетрамер изнутри.

Кроме того, в центральной полости гемоглобина есть несколько (3 из 33 групп) положительно заряженных аминокислотных радикала, способных специфически взаимодействовать с 2,3-дифосфоглицератом. Это взаимодействие снижает сродство гемоглобина к кислороду, являясь одним из механизмов регуляции активности гемоглобинтранспортирующей системы (см. подпараграф 2.3.1).

2.2. Физико-химические свойства гемоглобина

2.2.1. Физико-химические свойства гема

При действии на гемоглобин концентрированной уксусной кислоты в присутствии хлорида натрия гем переходит в гемин, в котором железо трехвалентно и его третья валентность связана с хлором.

При действии на гемоглобин щелочей гем переходит в гематин, в котором атом железа также трехвалентен, и его третья валентность связана с гидроксильной группой. Гем, входящий в состав гемоглобина, ускоряет реакцию окисления субстратов ($S \cdot H_2$) перекисью водорода, т.е. действует подобно ферменту пероксидазе: $S \cdot H_2 + H_2O_2 = S + 2H_2O$. Это объясняется сходством строения протетических групп гемоглобина и пероксидазы.

Однако в отличие от фермента гемоглобин сохраняет каталитические свойства при кипячении и действии сильных денатурирующих кислот. Сведберговы единицы гемоглобина легко диссоциируют под влиянием амидов, повышенной концентрации солей с образованием, главным образом, симметричных димеров ($\alpha\beta$) и, частично α - и β -мономеров.

Гем, как и все природные свободные порфирины, является амфолитом (изоэлектрическая точка 3,5-4,5), поэтому в свободном состоянии нерастворим в воде, спиртах, петролейном эфире, но хорошо растворим в минеральных кислотах,

водных щелочах, особенно хорошо в водном растворе аммиака. При обработке щелочью (0,01-0,1 М NaOH) происходит полное разрушение связей Fe-белка.

2.2.2. Физико-химические свойства нативной молекулы гемоглобина

Гемоглобин хорошо растворим в воде и нерастворим в спирте, эфире и хлороформе. В эритроцитах гемоглобин находится в растворенном состоянии, несмотря на то, что его содержание составляет более 30%. При изменении аминокислотного состава глобина может произойти и изменение его растворимости, как у HbS.

Спектр поглощения гемоглобина (в оксиформе) состоит из трех главных полос: 414 нм (полоса Сорэ), 576—578 нм (α -полоса) и 542—544 нм (β -полоса). Интенсивность полосы Сорэ значительно выше, чем α - и β -полос.

В спектре поглощения дезоксигемоглобина полоса Сорэ соответствует 429 нм, а следующий единственный максимум регистрируется при 556 нм.

Спектрофотометрическое отличие оксигемоглобина от карбоксигемоглобина состоит в пике поглощения при 920 нм, а также в том, что полоса Сорэ для карбоксигемоглобина сдвинута к 422 нм, а пики α и β фиксируются при 570 и 540 нм. Интенсивность максимумов поглощения не зависит от типовых принадлежностей гемоглобина.

Молекулярная масса основных типов гемоглобина колеблется в пределах 64 500—68 000 Д. Молярная масса гемоглобина, растворенного в плазме, может достигать до 3 000 000 Д. Молекулярная масса различных протомеров колеблется от 16 000 до 17 000 Д.

Размер Hb составляет 6,8 нм; размер миоглобина — 3,6 нм.

Белковая часть Hb характеризуется очень высоким содержанием остатков гистидина. Это придает ему значительную буферную емкость при pH около 7, что весьма важно для той роли, которую играют эритроциты в переносе кровью дыхательных газов.

Изоэлектрическая точка различных типов гемоглобина колеблется от 6,8 до 7,18.

Растворимость гемоглобина в водных растворах определяется соотношением гидрофильных и гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности тетрамера.

Поскольку конформация и число гидрофильных участков на поверхности меняются в процессе оксигенации, следова-

тельно, растворимость оксигемоглобина в воде в два раза выше, чем дезоксигемоглобина.

Так как простетическая группа гема входит в состав целой группы ферментов, гемоглобины проявляют оксидазные свойства, характерные для этих ферментов, в частности: каталазную и пероксидазную активность. Причем пероксидазная активность отдельных типов гемоглобина может быть различна.

Диссоциация гемоглобина представляет обратимый динамический процесс, равновесие которого зависит от концентрации белка. При высокой концентрации гемоглобина (физиологические условия) равновесие сильно сдвинуто в сторону образования тетрамера, так как субъединицы Hb имеют высокое сродство друг к другу. Поэтому при нормальных условиях концентрация мономеров относительно мала или они вообще отсутствуют.

При снижении концентрации гемоглобина до 10^{-5} — 10^{-7} М и ниже равновесие смещается в сторону образования димеров и в меньшей степени мономеров.

Так как наиболее прочные межмолекулярные взаимодействия имеются между α_1 — β_1 и α_2 — β_2 -глобулами (см. четвертичную структуру Hb), в молекуле гемоглобина выделяются димеры α_1 — β_1 и α_2 — β_2 . Между этими димерами в тетрамерной структуре Hb возникают полярные (ионные и водородные) связи. Поэтому при изменении pH среды в кислую или щелочную сторону, в первую очередь, разрушаются связи между этими димерами.

2.3. Свойства, определяющие транспортно-дыхательную функцию гемоглобина

Ежедневная *средняя* потребность человека в газообразном кислороде составляет около 600 л. Средние суточные потребности взрослого мужчины в кислороде в состоянии полного покоя составляют примерно 375 л чистого кислорода. Такое количество O_2 (н.у.) содержится в 1900 л воздуха.

При сидячей работе потребность в кислороде возрастает, по крайней мере, вдвое. У тренированного спортсмена во время соревнований скорость потребления кислорода превышает уровень покоя иногда в 10 раз.

Объем циркулирующей крови составляет в среднем 70 мл/кг массы тела, а число циркулирующих эритроцитов — $350 \cdot 10^9$ кг.

Ключевая роль в выполнении гемоглобином кислородсвязывающей функции принадлежит иону Fe^{2+} . Экспериментально полученные модифицированные гемоглобины, в которых железо заменено на Mn (II), Mn (III), Ni (II), Cu (II), Zn (II), не способны обратимо связывать кислород.

Очевидно, это свойство комплексов может быть объяснено различием числа *d*-электронов указанных металлов. Атомы металлов Ni (II), Cu (II) и Pd (II) в металлопорфиринах лежат в плоскости, образованной четырьмя координированными с ними пиррольными атомами азота.

В железопорфиринах имеется существенное отличие пространственного расположения центрального металла (Fe): атом железа (II) на 0,04—0,05 нм выведен из плоскости порфиринового кольца.

2.3.1. Взаимодействие с кислородом

В артериальной крови практически весь гемоглобин (95—98%) связан с кислородом, т.е. находится в оксигенированной форме. В венозной крови содержание оксигемоглобина составляет 67—75%, остальная часть приходится на долю свободного гемоглобина. Каждый грамм гемоглобина несет 1,36 мл O_2 при полном насыщении.

Обратимое присоединение кислорода (оксигенация), позволяющее гемоглобину выполнять свою основную функцию переносчика, обеспечивается возможностью образовывать прочные пятую и шестую координационные связи и переносить электрон на кислород не от железа, что сопровождалось бы окислением железа до Fe^{3+} , а от имидазольного кольца проксимального гистидина.

Оксигенация-дезоксигенация гемоглобина сопровождается его обратимыми конформационными изменениями (рис. 2.6).

Каждая Сведбергова единица гемоглобина (как и молекула миоглобина) содержит один гем и, следовательно, один активный связывающий лигандый центр. Реакции связывания подобных белков с лигандами описываются простой гиперболической зависимостью.

Присоединение O_2 обеспечивается содержанием в геме атома Fe^{2+} . Эта реакция обратима и зависит от парциального давления O_2 .

Оксигенирование гемоглобина является ступенчатым процессом, который можно выразить уравнением:

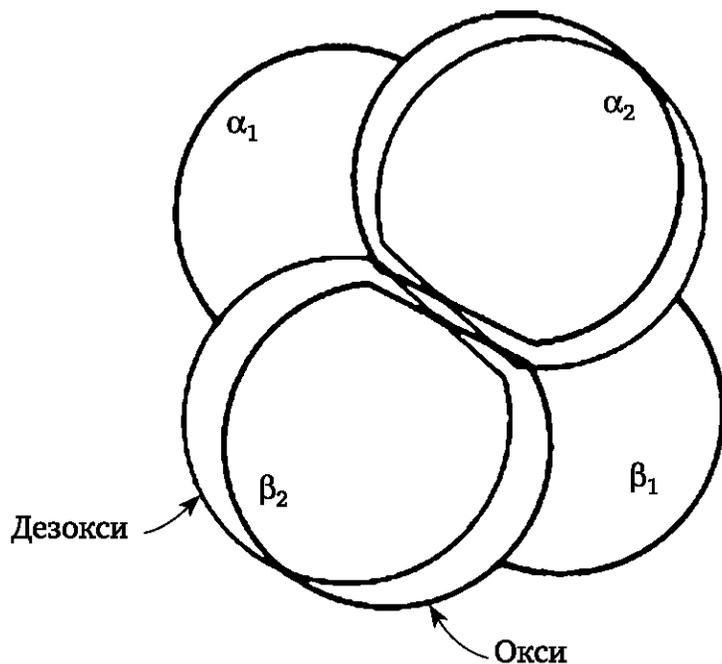
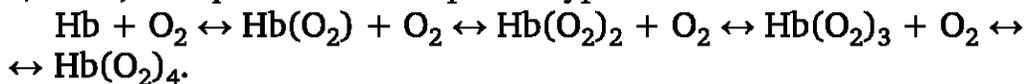


Рис. 2.6. Схема, иллюстрирующая изменения четвертичной структуры гемоглобина при оксигенировании

Одна пара субъединиц сдвигается по отношению к другой путем поворота на 15° и продвижения на $0,8 \text{ \AA}$ (по Л. Страйеру)

При взаимодействии гемоглобина-тетрамера с O_2 четко прослеживается *кооперативный эффект* — средство к кислороду каждой Сведберговой единицы зависит от состояния соседних Сведберговых единиц.

Между гемами одной молекулы гемоглобина существует некоторая связь, получившая название *гем-гем взаимодействия*, суть которой сводится к тому, что присоединение кислорода к одному гему влияет на присоединение кислорода к другому гему той же молекулы.

Сродство гемоглобина к кислороду при присоединении первой молекулы O_2 минимально, но возрастает при присоединении каждой следующей молекулы кислорода. Последняя (четвертая) молекула кислорода присоединяется к гему в 500 раз быстрее, чем первая (рис. 2.7).



Рис. 2.7. Пояснение хода оксигенирования гемоглобина на примере почтовых марок

Для того чтобы оторвать одну марку из четырех, нужно разорвать две перфорированные стороны. Чтобы отделить вторую марку, нужно произвести разрыв только с одной стороны; чтобы отделить третью — тоже с одной. После этого четвертая марка остается свободной (по Л. Страйеру)

2.3.2. Транспорт CO_2

Кроме транспорта O_2 к тканям Hb осуществляет обратный транспорт главного конечного газового метаболита тканей — углекислого газа. Гемоглобин переносит значительную долю общего углекислого газа и катионов водорода. Примерно 15—20% углекислого газа и ионов H^+ , присутствующих в крови, переносится молекулами Hb . Гемоглобин связывает два протона на каждые четыре освободившиеся молекулы кислорода.

CO_2 является ангидридом угольной кислоты: в водном растворе примерно одна молекула углекислого газа из четырехсот превращается в H_2CO_3 . В крови, в отличие от водных растворов *in vitro*, этот процесс идет гораздо активнее, благодаря каталитическому действию эритроцитарной карбоангидразы: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$. Угольная кислота является слабой, следовательно, диссоциирует на ионы: $\text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$.

Сродство Hb к O_2 , с одной стороны, и к CO_2 и H^+ , с другой, имеет обратную зависимость, определяемую концентрацией ионов водорода (величиной pH). Это обратимое явление известно как **эффект Бора** (в честь датского физиолога Христиана Бора, впервые открывшего этот эффект). Эффект Бора (или Вериге-Бора) обусловлен изменениями в третичной структуре Hb.

Эффектом Бора в общей формулировке называют «влияние pH среды на взаимодействие атома железа в молекулах дыхательных пигментов с различными лигандами — O_2 , CO, NO. Сюда же относится зависимость от pH окисления Fe^{2+} до Fe^{3+} ». В узком смысле под эффектом Бора понимают зависимость сродства Hb к кислороду от концентрации H^+ . Ниже будет рассмотрен этот аспект эффекта Бора.

Изменение сродства гемоглобина к кислороду в зоне $pH > 6,5$ (в основном — щелочная зона) обозначается как *прямой* (или *щелочной*) эффект Бора, а в зоне pH ниже 6,0—6,5 (кислая среда) — *обратный* (кислый) эффект Бора.

Обратный эффект Бора, несмотря на свою теоретическую важность, не имеет физиологического значения, так как значение pH ниже 6 в условиях человеческого организма маловероятно.

В процессе оксигенации-дезоксигенации гемоглобина происходит обратимое отщепление-присоединение протонов от атомов азота остатков гистидина (146) в β -цепях и их высвобождение в результате разрушения солевых мостиков. Эти протоны сдвигают равновесие в сторону образования угольной кислоты, которая расщепляется карбоангидразой с образованием углекислого газа. Образование солевых мостиков форсирует освобождение кислорода из оксигенированной R-формы гемоглобина.

Глава 3

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕМОГЛОБИНОВ

3.1. Номенклатура и классификация гемоглобинов

Для лучшей ориентации в терминологии гемоглобинов следует их классифицировать с точки зрения происхождения и функциональной значимости (табл. 3.1). Выделяют:

- **типы (генотипы) Hb** — разновидности гемоглобина, у которых при идентичной структуре простетических групп гема имеются различные составы протомеров глобина. Варибельные полипептидные цепи разных типов Hb кодируются различными генами, что обуславливает различия их аминокислотных последовательностей. А так как первичная структура белка определяет единственно оптимальную конфигурацию высших структур, гемоглобины различных типов различаются третичной и четвертичной структурами. В свою очередь от структуры зависят индивидуальные свойства гемоглобинов. Именно пространственная конформация обеспечивает их различия по физико-химическим свойствам и функциональной активности. Ниже будут приведены сведения о главных нормальных типах гемоглобина;

- **производные гемоглобина:** солянокислый гематин, карбоксигемоглобин (HbCO), циангемоглобин (CNHb), метгемоглобин (MetHb), азид-метгемоглобин (NaN₃Hb), сульфгемоглобин (SHb), азидметгемоглобин (NaN₃MetHb) и другие, образующиеся *in vivo* или *in vitro* в результате взаимодействия Hb с различными веществами (чаще с газами). Такие соединения не физиологичны, а иногда даже токсичны, но образование многих из них используют для количественной оценки Hb:

- **карбоксигемоглобин** (оксиуглеродный гемоглобин) образуется при взаимодействии Hb с угарным газом (CO). Сродство гемоглобина к оксиду углерода (II) в 300 раз выше, чем к кислороду. Это объясняет высокую токсичность CO, который выво-

дит из строя гемоглобин, не давая ему участвовать в переносе O_2 . Карбоксигемоглобин диссоциирует в сотни раз медленнее, чем оксигемоглобин, поэтому даже незначительная концентрация (0,07%) в воздухе угарного газа является летальной, так как связывает около 50% имеющегося в организме гемоглобина, лишая его транспортно-дыхательной функции. В карбоксигемоглобине железо двухвалентно;

– *сульфгемоглобин*. В норме сульфогемоглобина в крови нет. Он появляется при взаимодействии Hb с сульфопроизводными, в том числе и с некоторыми сульфаниламидами, при отравлениях соединениями сурьмы, фенацетином, бромом, сульфонидами, нитратами (колодезная вода), серными соединениями и пр. Образование сульфгемоглобина — необратимый процесс *in vivo*. Эритроциты, содержащие сульфгемоглобин, разрушаются в те же сроки, что и нормальные, явлений гемолиза не наблюдается, поэтому сульфгемоглобин может находиться в крови в течение нескольких месяцев. На этом свойстве сульфгемоглобина основан метод определения сроков пребывания нормальных эритроцитов в периферической крови. Определение сульфогемоглобина в крови можно произвести спектроскопически. Сульфогемоглобиновый спектр не изменяется от прибавления сульфида аммония, но исчезает от прибавления $Na_2S_2O_4$ и 2 мл 10% едкого натра, или нескольких капель 3% перекиси водорода;

– *метгемоглобин*, называемый также ферригемоглобином, образуется при взаимодействии Hb с окислителями, в том числе с избыточным количеством некоторых лекарственных веществ (фенацетин, антипирин, амилнитрит, сульфаниламиды и др.). В большинстве случаев метгемоглобин — соединение Hb с кислородом, но более стойкое, чем оксигемоглобин. При этом двухвалентное железо порфиринового ядра гема превращается в трехвалентное ($Fe^{2+} + O_2 \Rightarrow Fe^{3+} + O_2^-$).

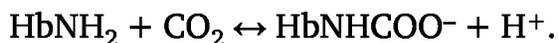
Метгемоглобин непрерывно образуется в небольших количествах в эритроцитах при дыхании. Для его восстановления в эритроците существует специальная метгемоглобинредуктазная ферментативная система, восстанавливающая метгемоглобин и превращающая его в нормальный дезоксигемоглобин. Так что в цельной крови здорового человека метгемоглобин не превышает 2% общего содержания гемоглобина (0,3—3,0 г/л). Вследствие того что прочность соединения O_2 в метгемоглобине гораздо выше, чем в оксигемоглобине, он перестает быть переносчиком кислорода. Опасность метгемоглобинемии для организма заключается в резком нарушении отдачи кислорода тканям, в силу чего развивается аноксия.

Однако метгемоглобин обнаруживает и другие свойства: он легко связывает CN^- с образованием цианметгемоглобина и спасает организм от смертельного действия цианидов, поэтому для лечения отравлений цианидами применяют метгемоглобинообразователи;

- **функциональные формы Hb.** В крови гемоглобин существует, по крайней мере, в четырех формах: *редуцированный гемоглобин* (его также называют феррогемоглобин или дезоксигемоглобин) и *оксигемоглобин*, обеспечивающие нормальную транспортно-дыхательную функцию организма, *карбгемоглобин* и *метгемоглобин*. Правда, метгемоглобин вряд ли можно отнести к нормальным типам Hb, точнее его можно назвать неизбежно образующимся непатологическим метаболитом.

В процессе функционирования в эритроцитах циркулирующей крови Hb находится в состоянии обратимой непрерывной реакции. Hb в венозной крови, где парциальное давление кислорода низкое, связан с одной молекулой воды *дезоксигемоглобин*. В артериальной крови с высоким парциальным давлением кислорода Hb соединен с одной молекулой кислорода — *оксигемоглобин*. Обе эти формы (редуцированный и оксигенированный) являются двумя ипостасями нормального Hb и легко переходят друг в друга.

К физиологическим формам гемоглобина можно отнести также *карбгемоглобин*, который образуется в результате взаимодействия CO_2 не с протетической группой гема, а с NH_2 -группами глобиновой части гемоглобина в соответствии с уравнением:



Причем, дезоксигемоглобин связывает больше CO_2 , чем оксигемоглобин. 5—10% углекислого газа крови транспортируется к легким именно таким образом.

Карбгемоглобин легко диссоциирует в капиллярах легких на гемоглобин и CO_2 .

Гемоглобин обладает способностью вступать в диссоциирующие соединения не только с кислородом и углекислым газом, но и с другими газами. В результате таких взаимодействий образуются производные Hb, наиболее значимыми из которых являются: карбоксигемоглобин, сульфгемоглобин и метгемоглобин.

Классификация гемоглобинов

Группа	Подгруппа	Принцип классификации	Основные представители
Типы (генотипы) гемоглобинов	Физиологические (нормальные)	Разновидности Hb, различающиеся составом и строением протомеров своего глобина. Варибельные полипептидные цепи разных типов Hb кодируются различными генами, что обуславливает различия их первичной, а следовательно, и высших структур глобина. Индивидуальные свойства гемоглобинов определены их структурами, что обеспечивает различия по физико-химическим свойствам и активности	Гемоглобин A ₁ (HbA ₁), гемоглобин A ₂ (HbA ₂), фетальный Hb (HbF), эмбриональный Hb (HbP; HbE) и др.
	Патологические		HbS(B), HbC, HbD, HbE, HbG, HbH, HbI, HbJ, HbK, HbL, HbM, HbN, HbO, HbP, HbQ, Hb-Бартс, Hb Beth (Nagel, США), Hb Austin (Moo-Peen, США), Hb Djelfa (Labie, Франция), Hb Hrosaki (Ohba, Япония) и др.
Функциональные формы Hb		Физиологические формы гемоглобина, присутствующие в крови в норме. Большинство из них обеспечивают нормальную транспортно-дыхательную функцию организма	Дезоксигемоглобин, оксигемоглобин, карбоксигемоглобин (HbCO ₂) и метгемоглобин (MetHb)
Химические производные гемоглобина		Образуются <i>in vivo</i> или <i>in vitro</i> в результате взаимодействия Hb с различными веществами (чаще — газами). Такие соединения не физиологичны, а иногда даже токсичны, но образование многих из них используют для количественной оценки Hb	Солянокислый гематин, карбоксигемоглобин (HbCO), циангемоглобин (CNHb), азид-метгемоглобин (NaN ₃ Hb), сульфгемоглобин (SHb), азидметгемоглобин (NaN ₃ MetHb) и др.

3.2. Характеристика основных типов гемоглобинов человека

С помощью физико-химических методов исследования, таких как различные варианты электрофореза и хроматографии, удалось установить неоднородность человеческого гемоглобина, существование различных его типов как в нормальных условиях, так и при развитии патологических состояний.

Типовая гетерогенность гемоглобина генетически обусловлена (см. параграф 4.1.). Различные варианты гемоглобина возникают вследствие различных мутаций в глобиновых генах. Принципиальной особенностью являются отличия в построении аминокислотной последовательности протомеров разных типов гемоглобина. Зачастую незначительные изменения первичной структуры цепей приводят к заметным изменениям высших структур, физико-химических свойств и функции белка.

Современная номенклатура типов гемоглобина была принята на X Международном гематологическом конгрессе в Стокгольме в 1964 г. Типы гемоглобина обозначают буквами латинского алфавита от А до G и S. Для обозначения новых гемоглобинов пока не рекомендуется использовать остальные буквы алфавита — лучше их называть по месту открытия. Полипептидные цепи гемоглобинов должны обозначаться греческими буквами. Все многообразие типов гемоглобина можно разделить:

- на постоянно присутствующие в крови человека, например HbA₁ и HbA₂;
- появляющиеся только на определенных этапах развития организма. Это HbP, HbF и др.;
- патологические формы — HbS, HbC, HbE и др.

3.2.1. Физиологические типы гемоглобинов

К наиболее значимым и изученным типам гемоглобина человека относятся:

- гемоглобин взрослого — HbA (от лат. *adults* — взрослый), включающий более 300 подтипов, главные из которых HbA₁, HbA₂;
- фетальный гемоглобин — HbF (от лат. *fetus* — плод);
- примитивный или эмбриональный гемоглобин — HbP (от греч. *embryon* — зародыш).

У высших животных и человека гемоглобин все типов состоит из четырех субъединиц-мономеров.

Гемоглобин А₁. В крови взрослого человека основным является тип НбА₁, который составляет до 98% от общего Нб. Его синтез начинается уже на 6—8-й неделях развития плода. Тетрамер состоит из двух α- и двух β-протомеров. В тетрамере их обозначают как α₁, α₂, β₁ и β₂. Полипептидные цепи α-протомеров включают по 141 аминокислотному остатку, β-протомеры — по 146 аминокислот. Таким образом, вся молекула белковой части гемоглобина А₁ состоит из 574 аминокислот. Причем, α-полипептидная цепь заканчивается комбинацией аминокислот валин-лейцин, а β-полипептидная цепь — комбинацией валин-гистидин-лейцина.

Изоэлектрическая точка НбА, по данным разных авторов, составляет 6,95—7,18. Как было указано выше, НбА начинает синтезироваться с 6—8-недельного возраста эмбриона, но до 30—36 недель развития плода количество его остается постоянным — 5-10% от общего гемоглобина. В конце первой трети эмбриогенеза находят около 5% НбА₁, на 9—18-й неделях он составляет 8—14% всего гемоглобина.

Последовательность расположения аминокислот в α- и β-цепях гемоглобина ряда высших животных и человека полностью выяснена. Во многих положениях α- и β-цепи содержат одинаковую аминокислотную последовательность, поэтому они имеют практически одинаковые третичные пространственные структуры.

Гемоглобин А₂. Гемоглобин А₂ (медленный) находится в организме взрослого в меньшей концентрации: референтные пределы 1,5—3,5% от общего гемоглобина. Характеризуется более высоким, нежели у НбА₁, сродством к кислороду. Тетрамер состоит из двух α- и двух δ-протомеров. δ-цепи гемоглобина А₂, как и β-цепи гемоглобина А₁, включают 146 аминокислотных остатков, но отличаются от последних заменой аминокислотных остатков в положении 9, вместо серина находится треонин, в положении 12 вместо треонина — аспарагиновая кислота, в положении 22 вместо треонина — аланин. Известно около 20 мутаций δ-цепи, которые снижают функциональные возможности и пластичность эритроцитов.

Очищенный препарат НбА₂ получают методом хроматографии на колонке с диэтиламиноэтил-целлюлозой. В 1960 г. Meuering с соавторами обнаружили помимо основного компонента НбА₂ еще и минорный НбА₁².

Изоэлектрическая точка НбА₂, по данным разных авторов, находится в пределах 7,4—7,6.

В процессе электрофоретического разделения при рН 8,6 он движется к аноду медленнее основной фракции HbA₁. Электрофоретическая подвижность минорного HbA₁² еще ниже.

Определение HbA₂ возможно методами электрофореза на бумаге, крахмальном геле, агаровом геле, а также ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе и ДЕАЕ-сефадексе.

Гемоглобин Р. Примитивный гемоглобин Р имеет синоним эмбриональный — HbE. Название HbP было предложено Allison в 1955 г., но в то время термин относился к Hb эмбрионов мыши, а позднее закрепился за эмбриональными типами гемоглобинов и других животных и человека.

Этот тип Hb обладает более высоким, чем HbA₁, сродством к кислороду. Также является тетрамером. Синтезируется в раннем эмбриогенезе в эмбриональном желточном мешке и находится в эритроцитах зародыша с 4-й по 18-ю неделю эмбрионального развития, в основном между 5-й и 12-й неделями.

Все подтипы эмбрионального гемоглобина находятся в одних и тех же мегалобластах. HbP представлен подтипами Gower-I, Gower-II, Hb-Portland и др. Содержание Hb-Gower-1 в крови обычно больше, чем Hb-Gower-2. На более поздних стадиях развития они исчезают полностью. В результате детальных исследований установили, что гемоглобины Gower-I, Gower-II и Portland имеют в составе ζ-, ε-, γ- и α-цепи. ζ-цепи появляются раньше других в эмбриональном развитии и напоминают по аминокислотному составу α-цепи. Gower-II представлен двумя α-цепями и двумя полипептидами, отличающимися первичным строением от всех ранее известных цепей и получившими название ε-цепей, которые по аминокислотному составу близки к β-цепям. Гемоглобин Gower-I является тетрамером типа ε₄. Оба главных подтипа HbP являются тетрамерами, различающимися структурой только одной из двух пар полипептидных цепей: Gower-I — ε₄; Gower-II — α₂ε₂. Кроме того, в раннем эмбриогенезе был обнаружен гемоглобин типа γ₄.

Появление Hb-Portland (ζ₂γ₂), вероятно, связано с гибридизацией Hb-Gower-1 и HbF при гемолизе мегалобластов желточного мешка и макроцитов печеночного кроветворения. Его количество достигает максимального значения от 2 до 5% на 54-е сутки эмбриогенеза, а к 10-й неделе он практически полностью исчезает. Если эмбриональные гемоглобины обнаруживаются в крови новорожденного, это является признаком врожденных аномалий развития.

По физико-химическим свойствам эмбриональный гемоглобин сходен с фетальным гемоглобином. HbP и HbF имеют

близкие параметры по спектру поглощения, коэффициенту седиментации — 4,5 S, а также оба характеризуются высокой щелочной резистентностью.

Но, в отличие от HbF, эмбриональный гемоглобин имеет меньшую электрофоретическую подвижность. Причем Gower-I движется к аноду медленнее, чем Gower-II. Это можно объяснить наличием в Gower-II α -цепей (см. выше), которые обеспечивают большую электрофоретическую подвижность.

Гемоглобин F. Гемоглобин F — тетрамер, состоящий из двух α - и двух γ -цепей. В γ -цепи, в отличие от β -цепи, содержится меньше валина, пролина, гистидина, но больше — изолейцина, серина, треонина. Кроме того, в состав γ -цепи входит изолейцин, который отсутствует в гемоглобинах A и A₂. Общее количество аминокислотных остатков в γ -цепи, как и в β - и δ -цепях, равно 146. Существует несколько разновидностей γ -цепей. В 136-м положении может находиться гли или ала. Соотношение γ^A - и γ^G -цепей у эмбриона — 1:3, у новорожденного — 7:3, у взрослого человека — 2:3. Всего известно более 60 мутаций γ -цепи.

Фетальный гемоглобин начинает синтезироваться через две недели после формирования печени плода, а именно с 12-й недели эмбрионального развития, и к 6 месяцам замещает примитивный гемоглобин, становясь основным гемоглобином плода. С 9-й по 13-ю неделю возраста эмбриона фетальный гемоглобин представляет собой основную массу гемоглобина. Вслед за этим постепенно появляется обыкновенный гемоглобин человека (HbA₁).

Количество HbF постепенно уменьшается параллельно увеличению количества HbA₁ и к моменту рождения составляет, по данным разных авторов, 50—80% от общего Hb. Такое замещение происходит вследствие постепенного снижения продукции γ -цепей глобина и постепенного увеличения синтеза β -цепей созревающими эритроцитами. В крови взрослого человека на долю HbF приходится не более 1,5% от общего гемоглобина.

Его изоэлектрическая точка по разным литературным источникам — 6,9—7,15.

HbF человека, в отличие от фетальных гемоглобинов большинства животных, обладает повышенной устойчивостью к денатурирующему воздействию щелочей, что используется при его клиническом определении.

В отличие от HbA, фетальный гемоглобин менее растворим в цитратно-фосфатном буфере с рН 3,4. Это обстоятельство

используется для цитохимического выявления HbF в эритроцитах на мазке крови по Бетке.

Разделение взрослого и фетального гемоглобинов возможно также путем электрофореза в агаровом геле при pH 6,2: HbF движется к катоду с опережением, а также ионообменной хроматографией на ДЕАЕ-сефадексе А-50.

Эритроциты плода могут поглощать и отдавать кислород при более низком парциальном давлении, чем эритроциты взрослого. Несмотря на то, что к моменту рождения насыщение крови плода кислородом почти в два раза ниже, чем во внутриутробном периоде, повышенное сродство HbF к кислороду позволяет обеспечить достаточное снабжение тканей кислородом в условиях относительной гипоксии. Кроме того, эритроциты, содержащие HbF, обладают повышенной устойчивостью к разрушению.

Содержание HbF в крови взрослых людей с серповидноклеточной анемией увеличено до 30%. При наследственном *персистенции фетального гемоглобина* (синоним — наследственное поддержание высокого уровня HbF) гемоглобин взрослого почти полностью представлен фетальным гемоглобином.

Достоверное повышение HbF выявлено у недоношенных детей. Резкое снижение количества фетального гемоглобина наблюдается при эритробластозах, вызванных несовместимостью между матерью и плодом. Отмечается снижение содержания HbF у доношенных и недоношенных детей с гемолитической болезнью и у детей с задержкой внутриутробного развития.

Повышение концентрации фетального гемоглобина отмечается в крови взрослых людей при эндокринных нарушениях, интоксикациях, сердечно-сосудистой патологии, гематологических заболеваниях.

Установлено повышение концентрации фетального гемоглобина в крови при хронических гипоксиях, в частности, у больных ХИБС и ХОБЛ. Причем увеличение концентрации фетального гемоглобина в крови зависит от нарастания декомпенсации кровообращения, наличия сочетанной патологии, возраста пациентов и длительности заболевания. Показатель концентрации HbF повышается с нарастанием степени дыхательной недостаточности, при сочетанной патологии, с возрастом пациентов.

У людей, проживающих в условиях высокогорья, а также в Забайкалье и на Крайнем Севере в условиях хронической гипоксии, отмечается адаптивное повышение уровня HbF.

Причем интенсивность его накопления в крови намного превышает степень образования гемоглобина других типов.

В крови взрослого снижение HbF чаще наблюдается при гематологической патологии: лейкозе, лимфогранулематозе, тромбоцитопенической пурпуре, сфероцитарной гемолитической анемии.

3.2.2. Патологические типы гемоглобинов

Помимо физиологических типов Hb в настоящее время известно около 200 патологических его вариантов. Наличие в эритроцитах людей аномальных или патологических гемоглобинов определяет состояния, обозначаемые как гемоглобинозы, или гемоглобинопатии. Это наследственные аномалии кроветворения, при которых молекулы патологических гемоглобинов имеют измененную структуру, поэтому подобные заболевания относятся к группе так называемых молекулярных болезней.

Причиной возникновения патологических Hb является повреждение генов, отвечающих за синтез той или иной цепи гемоглобина (α , β , γ , ϵ).

Патологические типы гемоглобина, как и нормальные, различаются не по структуре протопорфиринового кольца, а по строению глобина. Разница может заключаться в изменении целых пар полипептидных цепей в гемоглобиновой молекуле или при сохранении тех же полипептидных цепей, в замещении на определенном месте первичной структуры одной аминокислоты на другую. Даже точечная мутация такого гена может привести к нарушению аминокислотной последовательности гемоглобиновых цепей и, соответственно, к изменению структуры гемоглобинового мультимера, его физико-химических свойств (электрофоретической подвижности, резистентности к щелочам, растворимости, изоэлектрической точки) и функции. Такая мутация может оказаться достаточной для полного изменения свойств гемоглобина. Подобные процессы являются основой развития гемоглобинопатий, относимых к молекулярным болезням.

Наиболее известным типом патологических гемоглобинов является гемоглобин S (HbS). Причиной его синтеза является замена в HbA₁ глутаминовой кислоты на валин в 6-м положении β -цепи, что обуславливает появление HbS, который имеет структуру $\alpha_2\beta_2$ и обнаружен у больных серповидно-клеточной анемией. У гетерозигот содержание гемоглобина S равняется 20—45%, у гомозигот — 60—90%.

Гетерозиготная форма аномалии протекает бессимптомно или сопровождается легкой гемолитической анемией. У гомозиготных особей уже с первых месяцев жизни развивается тяжелая форма серповидноклеточной анемии. Эта особенность приводит к образованию в капиллярах микроциркуляторного русла, где доля дезоксигемоглобина наиболее высока, агрегированных кристаллов HbS — *тактоидов*. Их вытянутая, веретенообразная форма механически деформирует эритроцит, придавая ему серповидную форму (рис. 3.1). Эритроциты принимают форму серпа и теряют способность переносить кислород. Это приводит к гемолитическим явлениям, ухудшению процессов микроциркуляции, что нарушает функции крови. В результате развивается тяжелая болезнь — *серповидноклеточная анемия*.



Рис. 3.1. Электронные микрофотографии нормального (а) и серповидного (б) эритроцитов (по Й. Тодорову)

Наиболее значимыми из патологических типов Hb в настоящее время являются: HbS, HbC, HbD, HbE, HbG, HbH, HbI, HbJ, HbK, HbL, HbM, HbN, HbO, HbP, HbQ, Hb-Бартс (табл. 3.2), а также возможные их комбинации (SC, SD и др.).

Таблица 3.2

Аномальные гемоглобины

Обозначение	Замещения	Особенности оксигенирования и другие свойства
M Iwate	His F8(87) α →Тур	α -цепи окислены, β -цепи имеют малое сродство к кислороду
M Hyde Parc	His F8(92) β →Тур	α - имеют малое сродство к кислороду, β -цепи окислены
M Boston	His E7(58) α →Тур	α -цепи окислены, β -цепи имеют малое сродство к кислороду

Обозначение	Замещения	Особенности оксигенирования и другие свойства
M Saskatoon	His E7(63) β →Tyr	α - имеют малое сродство к кислороду, β -цепи окислены
Zurich	His E7(63) β →Arg	Высокое сродство, уменьшенная кооперативность; аргинин не укладывается в лигандный карман
M Mivaukee	Val E11(67) β →Glu	α -цепи окислены, COO ⁻ может образовывать мостик с Fe(III)
Bristol	Val E11(67) β →Asp	Низкое сродство; COO ⁻ может образовывать солевой мостик с His E7
Sydney	Val E11(67) β →Ala	Неустойчив, геми легко отделяются от β -цепи
Hammersmith	Phe CD1(42) β →Ser	Низкое сродство — результат экранирования гема в лигандированной конформации
Bucuresti	Phe CD1(42) β →Leu	
Santa Ana	Leu F4(88) β →Pro	В β -цепи отсутствует гем
Boras	Lew F4(88) β →Arg	Высокое сродство — проксимальная сторона гема открыта
Koln	Val FG5(98) β →Met	Высокое сродство

На XVI Международном конгрессе гематологов в Японии в 1976 г. были сделаны сообщения о новых аномальных гемоглобинах: Hb Beth (Nagel, США), Hb Austin (Moo-Peen, США), Hb Djelfa (Labie, Франция), Hb Hrosaki (Ohba, Япония), Hb Waco (Moo-Peen, США).

Глава 4

ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОТИПОВ ГЕМОГЛОБИНА

4.1. Эволюция генотипов гемоглобина как механизм адаптации к условиям существования

Функция дыхания у различных групп животных осуществляется неодинаково. Существует три основных механизма обеспечения организма кислородом.

1. Малоактивные животные (простейшие, губки, кишечно-полостные, некоторые черви, моллюски, ракообразные) обеспечиваются кислородом путем *простой диффузии* через поверхность тела.

2. Высокоактивные животные, нуждающиеся в больших количествах кислорода, обладают соответствующими эффективными механизмами, обеспечивающими поступление кислорода в организм.

а) Насекомые и некоторые другие представители членистоногих обладают *трахейной системой*, пронизывающей все тело и доставляющей кислород непосредственно тканям и клеткам самых отдаленных от поверхности частей тела.

б) Транспорт кислорода к тканям при помощи *дыхательных пигментов* крови (позвоночные животные, некоторые черви) или гемолимфы (часть червей, ракообразных, моллюсков). У этой группы животных помимо органов дыхания, в которых происходит обмен газов, имеется сосудистая система, по которой движется кровь, вступая в контакт со всеми частями тела, и дыхательные пигменты, способные связывать кислород. Основным дыхательным пигментом, распространенным среди всех групп животных, является гемоглобин.

Эволюция гемоглобинов приматов подробно проанализирована Hill и соавторами в 1963—1964 гг. Гемоглобины различных животных обладают видовой специфичностью, обусловленной своеобразием строения белковой части молекулы.

Обезьяны Старого и Нового Света обладают гемоглобинами, очень сходными с человеческими. У макаки, например, β -цепь отличается от таковой у человека всего одним остатком: в 87-м положении (тре — у человека, глу — у макаки). Несколько больше отличаются от человеческих гемоглобины африканских лори и других низших приматов. α -цепь в ходе эволюции оказалась гораздо более стабильной, чем другие цепи. Хотя и в β -цепи аминокислоты с 30-й по 40-ю остаются неизменными во всех гемоглобинах приматов. Синтез четырех полипептидных цепей Hb человека контролируется четырьмя генами, обозначаемыми по названию цепей α -, β -, γ - и δ -, которые обязательно присутствуют в гаплоидном наборе хромосом здорового человека. В большинстве популяций человека ген α -глобиновой цепи находится в дублицированном состоянии.

На сегодняшний день хорошо изучена нуклеотидная последовательность всех глобиновых генов. Гены глобинов человека образуют мультигенные семейства и расположены на двух хромосомах в составе двух кластеров. α -кластер глобиновых генов (семейство ζ - и α -генов) занимает 25 000 пар оснований и находится в коротком плече 16-й хромосомы. Семейство ϵ -, γ -, β -, δ -генов (β -кластер) располагается на коротком плече 11-й хромосомы на участке в 60 нуклеотидов (рис. 4.1).

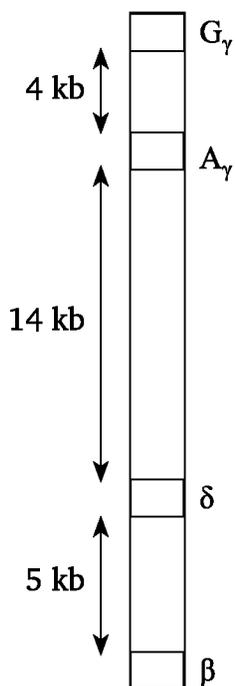


Рис. 4.1. Карта генов γ -, δ - и β -глобинов человека (по Л. Страйеру)

Гены в α -кластере расположены в следующем порядке (от 5' к 3'): ген эмбриональной ζ -цепи, псевдоген ζ -цепи, псевдоген α -цепи и два идентичных гена α -цепи.

Расположение генов в β -кластере следующее: ген эмбриональной ϵ -цепи, два гена фетальных γ -цепей, псевдоген β -цепи, ген δ -цепи и ген β -цепи. Порядок расположения этих генов совпадает с порядком их экспрессии в ходе онтогенеза. Все глобиновые гены имеют сходную функциональную организацию. Каждый из них имеет три кодирующие последовательности или три экзона. Между данными экзонами находятся две уникальные вставочные последовательности или интроны (IVS-1, IVS-2). Как известно, интроны транскрибируются вместе с экзонами и вырезаются в ходе процессинга для образования функциональной мРНК.

Очевидно, все α -, β -, γ -, δ - и ϵ -цепи возникли в ходе эволюции в результате дупликации и транслокации генов из единого исходного гемсодержащего белка, похожего на миоглобин.

В 1966 г. Fitch предположил, что исходный ген кодировал 88 аминокислот, а затем благодаря линейной неполной дупликации размер его увеличился до настоящих параметров.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей различных гемоглобиновых полипептидов дает следующую схему филогенеза, протекавшего на основе дупликаций исходного гена и последующей дифференциации дублированных участков ДНК:



Вероятно, около 1100 млн лет назад произошла дупликация гена-предшественника, давшая начало миоглобиновым и гемоглобиновым генам. Сходство первичной и высших структур миоглобина и глобиновых субъединиц очевидно (рис. 4.2).

Позднее, около 500 млн лет назад, на ранней стадии эволюции позвоночных произошла дупликация, давшая начало двум (α и β) семействам глобиновых генов, сопровождавшаяся транслокацией.

Примерно 200 млн лет назад очередная дупликация привела к возникновению в семействе β -глобиновых генов β -глобинов плодов и взрослых. Около 100 млн лет назад произошло образование ϵ - и γ -глобиновых генов и, наконец, 40 млн лет назад появились δ - и β -глобиновые гены.

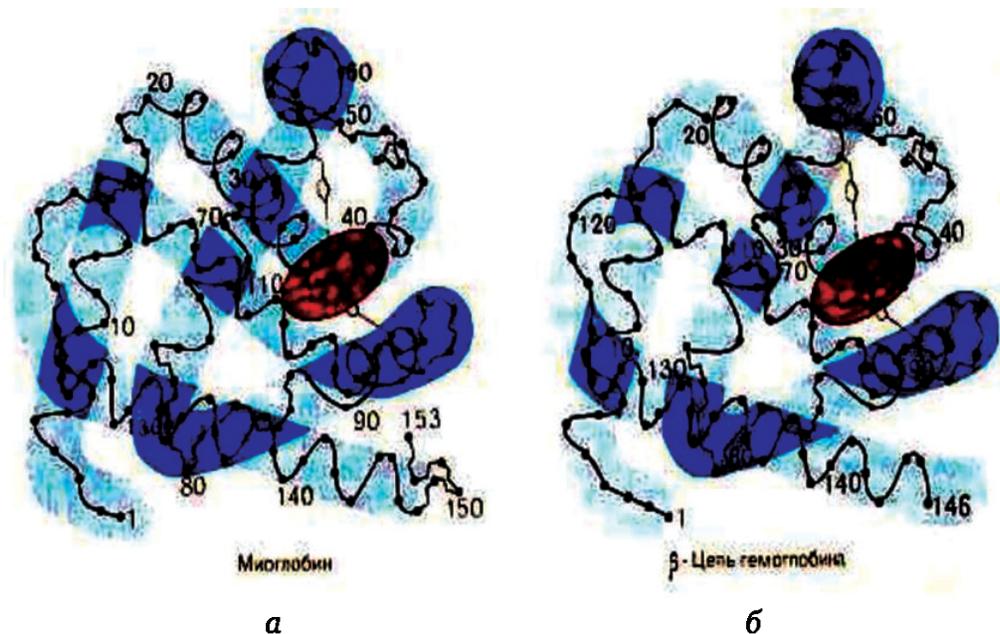


Рис. 4.2. Сравнение конформаций главной цепи миоглобина (а) и α -цепи гемоглобина (б) (по Л. Страйеру)

4.2. Динамика концентраций гемоглобинов в онтогенезе

4.2.1. Количественные изменения общего гемоглобина в онтогенезе

Нормальная концентрация гемоглобина у взрослого колеблется от 130 до 185 г/л (80—115%). За среднюю величину принимают 160 г/л (100%). Количество гемоглобина в крови у женщин несколько меньше (на 10%), чем у мужчин. Следовательно, нормальное содержание общего количества гемоглобина крови у мужчин составляет 135—170 г/л (8,56—10,7 ммоль/л), у женщин — 120—150 г/л (7,5—9,36 ммоль/л).

Концентрация гемоглобина в эритроците — 327—355 г/л (20,3—22,0 ммоль/л), абсолютное среднее содержание Hb в эритроците — 26,7—33,7 пг.

Гемоглобин в плазме крови. Нормальная плазма крови содержит следы гемоглобина, не превышающие 0,1 г/л. При интравитальном гемолизе концентрация гемоглобина в плазме повышается. Умеренные повышения (до 0,25 г/л) встречаются при иммунных гемолитических анемиях, анемии Кули, гемогло-

бинозе С, дрепаноцитозе и т.д. Выраженные увеличения (свыше 1 г/л) встречаются при всех гемоглинуриях.

Содержание гемоглобина снижается на ~ 10% в промежутке времени от 17 до 7 часов утра, а также после еды. Снижение гемоглобина от нормальных величин на ~ 6% наблюдается при взятии пробы в положении лежа. Незначительное, но диагностически значимое уменьшение нижнего порога нормальных величин гемоглобина встречается у мужчин возрастной группы 65—74 года.

При рождении ребенка пуповинная кровь содержит 140—190 г/л гемоглобина, но в течение первых часов антенатальной жизни общая концентрация гемоглобина повышается до 165—225 г/л. Через несколько дней после рождения содержание гемоглобина уменьшается и к концу первого месяца достигает нормальных для взрослого величин 160 г/л (100%).

Содержание гемоглобина обычно ниже у недоношенных, чем у доношенных новорожденных.

У детей в раннем возрасте нет различия между мужским и женским полом. В первые месяцы жизни наблюдается *трименонредукция* (трименонанемия) — нормальное временное постепенное снижение уровня гемоглобина, концентрация которого к третьему месяцу доходит до 63—82% (100—130 г/л). Это так называемая физиологическая анемия новорожденных. Затем содержание гемоглобина медленно повышается и к концу первого года жизни достигает средних величин — около 76% (120 г/л). После первого года жизни повышение продолжается и достигает нормальных для взрослого величин в пубертном периоде (табл. 4.1).

Так как у ребенка в первые месяцы жизни наблюдается физиологическая анемия, следует учитывать, что уменьшение концентрации Hb в этом возрасте до 60—65% не следует считать патологическим состоянием, нуждающимся в лечении.

Значительные колебания общего уровня гемоглобина крови в первые дни и месяцы жизни имеют глубокий физиологический смысл.

Повышение уровня гемоглобина в первые дни жизни объясняется, с одной стороны, феноменом *плацентарной трансфузии* — приливом крови из плаценты, а с другой — выходом плазмы из кровяного русла (*гемоконцентрацией*) с целью уменьшить увеличенный объем крови.

Таблица 4.1

Средняя концентрация гемоглобина в крови в периоды детского возраста, г/л

Возраст	Первые 4 дня	1/2 мес.	1 год	2 года	4 года	8 лет	12 лет
Концентрация Hb	195	115	120	121	125	130	134

Максимальные колебания средних величин $\pm 12\%$. В результате, в первые дни жизни общее количество гемоглобина достаточно высокое, что имеет большое физиологическое значение: избыток гемоглобина у новорожденного ребенка играет роль резерва железа на этот период жизни.

Трименоуредукция объясняется не только усиленным распадом эритроцитов, но, прежде всего, почти полным подавлением эритропоэза в этом периоде жизни. Запасов железа от перегрузки новорожденного гемоглобином хватает на 3—4 месяца.

4.2.2. Качественная и количественная трансформация гемоглобинового профиля в процессе онтогенеза

Период антенатального онтогенеза характеризуется последовательным изменением активности генов, кодирующих синтез различных цепей гемоглобина, что приводит к характерному изменению гемоглобинового профиля на разных стадиях эмбрио- и фетогенеза.

Приведенные выше данные подтверждаются динамикой дифференциальной активации и репрессии (включения и выключения) процесса синтеза разных типов гемоглобина в ходе онтогенетического развития человеческого организма, который соответствует правилу: «онтогенез повторяет филогенез».

В онтогенезе меняются свойства гемоглобина. Самыми ранними глобиновыми цепями эмбриона являются: ϵ -цепь, сходная с более поздней γ -цепью, α -цепь и очень близкая ей по строению ζ -цепь (гены α - и ζ -цепей расположены в одном участке 16-й хромосомы).

В первые недели после зачатия синтезируются гемоглобины типа HbF. Главным гемоглобином эмбрионов до 5—6 недель гестации является Hb Gower-I (ϵ_4). Hb Gower-II ($\alpha_2\epsilon_2$) обнаруживается у эмбрионов 4-недельной гестации и отсутствует у эмбрионов старше 13 недель. Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$) обнаруживается у ранних эмбрионов, но присутствует также у новорожденных с гомозиготной α -талассемией.

В период, когда печень замещает желточный мешок в качестве главного места эритропоэза, продукция ϵ - и ζ -цепей постепенно уменьшается параллельно с увеличением синтеза α - и γ -цепей.

К концу 12-й недели ϵ -цепь полностью исчезает, и с 12-й по 24-ю неделю почти весь гемоглобин плода состоит из α - и γ -цепей — HbF. Фетальный Hb также обнаруживается у очень ранних эмбрионов и является главным Hb в эмбриональной жизни. Он составляет 90—95% общего количества Hb у плода вплоть до 34—36 недель гестации.

Синтез HbA фиксируется у 9-недельных эмбрионов. У эмбрионов от 9-й до 21-й недель гестации количество HbA увеличивается с 4 до 13% общего количества Hb. После 34—36 недель гестации процент HbA продолжает увеличиваться, тогда как процент HbF начинает уменьшаться. Количество HbF в крови новорожденного варьирует от 53 до 95% общего количества Hb.

Концентрация HbF в крови уменьшается после рождения примерно на 3% в неделю и к 6 месяцам жизни составляет обычно менее 2—3% общего количества Hb. Эта скорость уменьшения продукции Hb тесно связана с гестационным возрастом новорожденного и, по-видимому, не зависит от изменений в среде и pO_2 , которые происходят во время родов.

Во вторую половину эмбрионального развития усиливается синтез β -цепей параллельно с подавлением синтеза γ -цепей, что приводит к увеличению количества HbA₁ в крови плода.

Незадолго до рождения в небольших количествах синтезируется δ -цепь, участвующая в образовании HbA₂, и это образование продолжается на протяжении всей последующей жизни. Содержание HbA₂ в крови здоровых детей значительно изменяется в первые годы жизни: от 0,2% при рождении до 2—3% у детей старше одного года.

После рождения отмечается постепенная репрессия синтеза HbF. Его концентрация в крови снижается примерно на 3% в неделю и к 6 месяцам жизни не превышает 2—3% от общего количества гемоглобина крови.

Репрессия и дерепрессия структурных генов α -, β -, γ -, δ - и ϵ -цепей на разных стадиях развития обеспечивает организм гемоглобином, физиологически оптимальным для данной стадии. Например, возникшая в результате эволюции β -цепь только благодаря незначительному отличию от α -цепи по аминокислотному составу и последовательности аминокислот, обеспечивает комплементарность α - и β -протомеров, что способ-

ствует формированию оптимальной тетрамерной структуры белка.

Каждый тип гемоглобина обладает физико-химическими и функциональными особенностями, обеспечивающими адаптивную специфику молекул Hb в разных микроусловиях организма. В результате этого транспорт дыхательных газов выполняет целое семейство гемоглобинов, количественное соотношение которых в норме адекватно возрастным особенностям организма.

Сравнение свойств миоглобина (или Сведберговых единиц гемоглобина) и мультимера гемоглобина показывает, что у Hb-тетрамера, по словам Л. И. Иржака (1975), «происходит снижение константы равновесия реакции взаимодействия гемоглобина с кислородом. Если более умеренное сродство к кислороду полезно для нормального снабжения тканей, то очевидно, что переход от мономерных форм к более сложным — это шаг адаптивной эволюции» [15].

Несмотря на то, что строение α -, β -, γ -, δ - и ϵ -цепей имеет много общего (см. выше), наибольшее сходство в первичной структуре отмечается между β -, γ -, δ - и ϵ -цепями, в то время, как аминокислотная последовательность α -цепей несколько отличается. Это можно объяснить тем фактом, что генетические локусы, кодирующие цепи β , γ , δ и ϵ тесно сцеплены и находятся в 11-й хромосоме человека, тогда как локус цепи α не сцеплен с ними и расположен в 16-й хромосоме.

Глава 5

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ И КАЧЕСТВЕННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ГЕМОГЛОБИНОВОГО ПРОФИЛЯ

Гемоглобин — эритроцитарный белок, его допустимое содержание в плазме не превышает 100 мг/л.

5.1. Общий гемоглобин крови

Определение количества гемоглобина в крови имеет большое значение для характеристики дыхательной функции крови в нормальных условиях и при самых различных заболеваниях, особенно при болезнях крови.

Снижение концентрации гемоглобина отмечается при анемиях различной этиологии.

Повышение общей концентрации гемоглобина крови может быть:

а) *физиологическим* — пребывание на больших высотах, чрезмерная физическая нагрузка или возбуждение;

б) *патологическим*:

– *абсолютное повышение Hb* при полицитемии, врожденных пороках сердца со сбросом крови справа налево, заболеваниях легких, приводящих к снижению легочной перфузии, плохой аэрации легких, легочной артериальной фистуле; болезни и синдроме Иценко-Кушинга, первичной гепатоме, хронических химических воздействиях нитритов, сульфанамидов, вызывающих образование мет- и сульфогемоглобина;

– *относительное повышение Hb* — гемоконцентрация при обезвоживании, длительном диарейном синдроме, дегидратации при ожогах, кишечной непроходимости, упорной рвоте.

При интравитальном гемолизе концентрация гемоглобина в плазме повышается. Умеренные повышения (до 0,25 г/л) встречаются при иммунных гемолитических анемиях, анемии Кули, гемоглобинозе С, дрепаноцитозе и других болезнях. Сильные увеличения (свыше 1 г/л) встречаются при всех гемоглобинуриях.

5.2. Изменение концентрации отдельных типов гемоглобина

Существует множество нозологических форм патологии красной крови, при которых имеет важное диагностически-прогностическое значение не только изменение количества общего гемоглобина крови, но и отдельных его типов.

Гемоглобинопатии. Это группа патологических состояний, обусловленная нарушениями структуры цепей глобина — заменой одной или нескольких аминокислот в цепи глобина, отсутствием участка цепи или ее удлинением.

Существуют четыре основных типа гемоглобинопатологии:

1. *гемолитические анемии*, вызванные нестабильностью гемоглобина;
2. *метгемоглобинемии*, обусловленные ускоренным окислением гемоглобина;
3. *эритроцитоз*, вызванный нарушением сродства гемоглобина к кислороду;
4. *серповидноклеточные нарушения* как следствие поврежденных клеточных мембран эритроцитов HbS.

Талассемии. Важную группу нарушений, связанных с аномалиями гемоглобина, представляют талассемии.

Изменение активности гена-регулятора ведет к количественному нарушению вплоть до полного прекращения синтеза той или иной полипептидной цепи в целом, что вызывает избыточное компенсаторное образование других полипептидных цепей. В результате появляются аномальные гемоглобины, характеризующие и обуславливающие талассемии.

Так, мутация α гена-регулятора отражается на синтезе всех гемоглобинов, содержащих α -цепи. Снижается скорость синтеза α -цепей гемоглобина — возникает *α -талассемия*.

β -талассемия развивается при нарушении синтеза β -полипептидной цепи при возникновении мутаций в β -регуляторном гене. В результате этого и в постнатальном периоде продолжают синтезироваться γ -цепи, что при сохранении синтеза

α -цепей приводит к образованию повышенных количеств гемоглобина F.

Талассемии сопровождаются анемиями, которые могут принимать очень тяжелые формы. В последние годы достигнут ощутимый прогресс в выяснении молекулярных механизмов, ответственных за развитие талассемии.

Изменение соотношения типов гемоглобина крови в клинической практике используют для диагностики различных патологических состояний.

Увеличение количества фетального гемоглобина наблюдается при гомозиготной форме β -талассемии, наследственном персистенции фетального гемоглобина, σ -, β -талассемии, серповидно-клеточной анемии.

Наряду с этим многие отечественные и зарубежные авторы указывают на повышение содержания фетального гемоглобина в эритроцитах взрослых людей при некоторых гемолитических анемиях и соматических заболеваниях. При этом авторы высказывают мнение о том, что повышение уровня HbF предшествует снижению содержания эритроцитов и гемоглобина в крови и является ранним признаком неблагополучия в эритроците. Многие авторы отмечают увеличение уровня фетального гемоглобина при хронических гипоксиях различной этиологии.

При недостаточности кровообращения наблюдается сдвиг кривой диссоциации оксигемоглобина вправо.

Эритроцитоз или преждевременный гемолиз ведут к преобладанию в кровяном русле популяции молодых клеток, что рассматривается как один из механизмов адаптации к гипоксии. Омоложение популяции эритроцитов при гипоксии ведет к улучшению показателей массопереноса O_2 за счет уменьшения роли «кислородного шунта».

Гипоксические состояния при болезнях сердца и легких. Выявлено достоверное повышение концентрации HbF в крови больных хронической ишемической болезнью сердца и хронической обструктивной болезнью легких по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе. Уровень HbF у таких больных нарастает также с возрастом, при наличии сочетанной патологии, прогрессировании сердечно-сосудистой и дыхательной недостаточности, особенно при длительности заболевания по анамнезу свыше 10 лет. Это свидетельствует о перестройке темпа синтеза цепей гемоглобина и об изменении соотношений гемоглобинов в эритроцитах.

Повышение уровня HbF в эритроцитах происходит за счет развития приспособительных реакций эритрона в условиях гипоксии и связана с частичной дерепрессией γ -цепи глобина на фоне напряженного эритропоэза.

Факт смены интенсивности синтеза различных фракций Hb в условиях хронической гипоксии имеет соответствующие причине объяснения. Вместе с тем существует единое мнение в том, что повышение уровня HbF — это биохимический механизм долговременной адаптации организма к гипоксии, в том числе при ХИБС и ХОБЛ.

Известно, что эритроциты плода могут поглощать и отдавать кислород при более низком парциальном давлении этого газа, они также более устойчивы к гемолизу, чем эритроциты взрослого человека. Возможно поэтому число эритроцитов, содержащих HbF, в условиях гипоксии начинает увеличиваться, что обеспечивает наиболее эффективную на данный момент оксигенацию и деоксигенацию тотального гемоглобина.

В патогенезе ИБС существенную роль имеет сродство гемоглобина к кислороду, которое, прежде всего, зависит от уровня 2,3-дифосфоглицериновой кислоты и кислотно-щелочного состояния крови. Имеющиеся в литературе сведения по этому вопросу противоречивы. У больных с сердечно-сосудистой недостаточностью, протекающей с тенденцией к ацидозу и повышением 2,3-ДФГК, сродство гемоглобина к кислороду снижается, что является важным компенсаторным механизмом в ответ на гипоксию.

Другие заболевания. При некоторых заболеваниях, а также при врожденных аномалиях крови в эритроцитах появляются аномальные (патологические) типы гемоглобина (см. 3.2.2.). Аномалии эритроцитов, связанные с содержанием гемоглобина F или H, лежат в основе развития *талассемии* и *метгемоглобинемии*.

Дыхательная функция некоторых аномальных гемоглобинов резко нарушена, что и является причиной развития патологических состояний. Например, анемии.

Свойства гемоглобина могут меняться при отравлении организма, например, угарным газом, вызывающим образование *карбоксигемоглобина*, или ядами, переводящими Fe^{2+} гема в Fe^{3+} с образованием метгемоглобина. Эти производные гемоглобина не способны переносить кислород.

Гемоглобин, освобождающийся при разрушении эритроцитов, — источник образования *желчных пигментов*.

5.3. Лабораторные методы определения гемоглобина

Все многообразие методик научного и лабораторного анализа гемоглобинов можно разделить:

- на качественное определение гемоглобина;
- количественный анализ.

5.3.1. Качественное определение гемоглобина

Если в исследуемом материале содержится кровь, то ее присутствие можно обнаружить по способности геминной группы катализировать окисление подходящих субстратов (бензидин, гваяковая смола) перекисью водорода.

Реакции на наличие крови являются, как правило, *качественными реакциями на гем*. Среди них наибольшее распространение в медицинской и судебной практике нашли бензидиновая проба и гваяковая проба. Эти реакции очень чувствительны и служат для определения минимальных количеств крови в биологических жидкостях. Для качественного определения железа используют пробы с гексацианоферратом (II) калия и роданидом аммония.

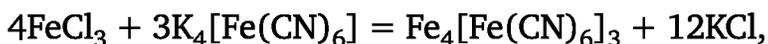
Бензидиновая проба. Метод основан на способности группы гема катализировать реакцию окисления бензидина в дифенохинондиимин перекисью водорода. Дифенохинондиимин конденсируется с молекулой неокисленного бензидина с образованием окрашенного комплекса сине-зеленого цвета, который при стоянии переходит в красный.

Ход определения: в пробирку наливают 1 мл разведенной в 5000 раз крови, добавляют 5 капель раствора бензидина и перекиси водорода. Отмечают появление окрашивания.

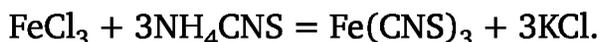
Гваяковая проба. Метод основан на способности геминной протетической группы катализировать реакцию окисления гваяковой кислоты перекисью водорода до ее озонида, окрашенного в синий цвет.

Ход определения: в пробирку вносят несколько капель разведенной в 5000 раз крови, кипятят ее в течение 1 мин на водяной бане. После охлаждения приливают к пробе 5 капель спиртового раствора гваяковой кислоты и 3 капли раствора перекиси водорода. Отмечают окрашивание.

Пробы с гексацианоферратом (II) калия и роданидом аммония. Метод основан на способности железа, входящего в гемоглобин, образовывать с гексацианоферратом (II) калия в присутствии соляной кислоты сине-зеленое комплексное соединение — берлинскую лазурь:



а с роданидами — роданид железа розового или красного цвета:



Ход определения: несколько капель дефибринированной крови помещают в фарфоровую чашечку и выпаривают досуха на песчаной бане. Сухой остаток озоляют, добавляют 2—3 капли концентрированной азотной кислоты и продолжают нагревание. Сухой остаток переносят в пробирку, добавляют 10 капель раствора соляной кислоты до растворения зола. Помещают содержимое в пробирку и добавляют 2 капли раствора гексацианоферрата (II) калия или роданида аммония и отмечают окрашивание.

5.3.2. Количественный анализ гемоглобина

Методы количественного определения гемоглобина разрабатывались с конца XIX в. и основными из них являются следующие.

Газометрические методы. Гемоглобин насыщается газом, например, кислородом, окисью углерода (II). По количеству поглощенного газа судят о количестве гемоглобина (Kubowitz F., 1956).

Определение железа в гемоглобиновой молекуле. Так как молекула гемоглобина содержит точно определенное количество железа, равное 0,347%, количество гемоглобина можно определить по количеству железа в его составе (Wong. S. Y., 1928, Mason E. C., 1964).

Колориметрические методы. Большинство колориметрических методов, газометрические методы и методы определения железа в гемоглобиновой молекуле точны, но сложны и требуют много времени и потому не нашли широкого практического применения.

Метод Сали. Наиболее известным из колориметрических геминных методов является метод Сали. Этот метод достаточно прост и быстр, но, к сожалению, неточен (ошибка метода достигает ~ 30%), поэтому в современной клинической лабораторной диагностике применяется крайне редко.

В методе Сали измеряется гематин, образовавшийся при взаимодействии гемоглобина с соляной кислотой. Метод основан на визуальной оценке содержания гемоглобина путем сравнения окраски исследуемой пробы со стандартными рас-

творами солянокислого гематина. На результаты определения влияют многие факторы: время реакции между гемоглобином и соляной кислотой, которое может колебаться от 2 до 40 мин в зависимости от содержания белков крови; оттенок цвета геминхлорида, зависящий от содержания билирубина в крови; характера освещения и пр.

Унифицированный гемоглобинцианидный метод. В настоящее время в клинико-диагностической практике широко применяются колориметрические циангемоглобиновые методы, характеризующиеся точностью и технической простотой. В большинстве стран эти методы приняты как стандартные и рекомендованы комитетом по стандартизации Европейского и Международного общества по гематологии (Deutscher Normenausschuss, Normentwurf DIN 58931, 1964; Boroviczeny K. G., 1964).

В России основным методом количественного определения гемоглобина в клинической практике является *унифицированный гемоглобинцианидный метод*. Преимущества этого метода заключаются в использовании надежных и стабильных циангемоглобиновых стандартов, устойчивого трансформирующего раствора, что позволяет измерять все клинически значимые фракции гемоглобина. Точность гемоглобинцианидного метода определяется тем, что в его основе лежит превращение всех форм гемоглобина в низкоспиновую окисленную форму — циангемоглобин.

Гемоглобинцианидный метод, разработанный в 1936 г. Драбкиным, был одобрен Международным комитетом по стандартизации в гематологии (ICSH) в 1963 г.

Принцип гемоглобинцианидного метода основан на переводе всех форм гемоглобина в одну — гемоглобинцианид. Одним из преимуществ метода кроме простоты и точности является тот факт, что HbCN — стабильное производное гемоглобина, и все имеющиеся в крови формы гемоглобина могут быть быстро и количественно превращены в HbCN.

Суть метода: кровь смешивают с реактивом Драбкина: KCN — 0,05 г, $K_3[Fe(CN)_6]$ — 0,2 г, дистиллированной воды — до 1 л. Под влиянием железосинеродистого калия (красной кровяной соли) гемоглобин окисляется в метгемоглобин, который под действием ацетонциангида затем превращается в циангемоглобин (гемоглобинцианид). Циангемоглобин имеет красноватый цвет, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации гемоглобина в пробе. Окрашенный цианметгемоглобин определяют колориметрически. Через 20 мин, необходимых для полного превращения гемо-

глобина в циангемоглобин, измеряют экстинкцию при длине волны 540 нм и толщине слоя 1 см против дистиллированной воды на спектрофотометре СФ-4 или на ФЭК-М или подобных ему фотоэлектроколориметрах.

Преимущества этого метода заключаются в использовании надежных и стабильных циангемоглобиновых стандартов, устойчивого трансформирующего раствора, что позволяет измерять все клинически значимые фракции гемоглобина.

Существуют и селективные методы колориметрии отдельных типов гемоглобина (методы Зингера, Бетке), но селективность их относительна: эти методы регистрируют щелочеустойчивую фракцию гемоглобина, к которой можно отнести как фетальный, так и примитивный (эмбриональный) типы гемоглобина. Метод Бетке, по сравнению с методом Зингера, обладает гораздо большей разрешающей способностью и отличается простотой.

Определение фетального гемоглобина по Зингеру в модификации Бетке. Метод основан на резистентности фетального гемоглобина (и некоторых других типов гемоглобина) к денатурирующему действию щелочей. HbF в 155 раз более устойчив к 1/12 раствору натриевой щелочи, чем нормальный гемоглобин. Вначале гемоглобин превращают в циангемоглобин, что не мешает определению. Из гемолизата получают циангемоглобиновый раствор путем прибавления $K_3[Fe(CN)_6]$ — KCN раствора (0,2 г $K_3[Fe(CN)_6]$ + 0,2 г KCN до 1000 мл дистиллированной воды). Через 30 мин 2,8 мл этого циангемоглобинового раствора смешивают с 0,2 мл 1,2 М раствора NaOH. Через 2 мин прибавляют 2 мл насыщенного раствора $(NH_4)_2SO_4$.

Коагулированный денатурированный HbA осаждают центрифугированием. HbF и другие щелочеустойчивые формы гемоглобина остаются в растворе. Концентрацию оставшегося в супернатанте гемоглобина определяют на спектрофотометре, отсчитывая экстинкцию фильтра (E_A) против воды при длине волны 540 нм.

Контрольные вопросы и тесты

1. Какой из дыхательных пигментов содержит медь?

- а) гемоглобин;
- б) гемоцианин;
- в) хлорокруорин;
- г) гемэритрин.

2. К какому из перечисленных лигандов гемоглобин обладает большей тропностью?

- а) O_2 ;
- б) CO_2 ;
- в) CO ;
- г) N_2 .

3. Массовая доля гемоглобина по отношению к общему белку эритроцита составляет:

- а) 10%;
- б) 40%;
- в) 75%;
- г) 90%.

4. На каком сроке гестации обнаруживаются в желточном мешке первые клетки эритропоэза?

- а) 1-я неделя;
- б) 2-я неделя;
- в) 4-я неделя;
- г) 6-я неделя.

5. На каком сроке гестации начинается миелоидный эритропоэз?

- а) 4-я неделя;
- б) 8-я неделя;
- в) 12-я неделя;
- г) 18-я неделя.

6. Какая из названных клеток эритропоеза является наименее дифференцированной?
- а) ретикулоцит;
 - б) нормобласт;
 - в) нормоцит;
 - г) первичный эритробласт.
7. В каких компартментах эритроидной клетки осуществляется синтез гема?
- а) ядро;
 - б) митохондрии;
 - в) рибосомы;
 - г) цитоплазма.
8. В тканях какого органа синтезируется эритропоэтин?
- а) почка;
 - б) печень;
 - в) красный костный мозг;
 - г) гипофиз.
9. Молекулярная масса гемоглобина A_1 составляет около:
- а) 150 000 Д;
 - б) 24 000 Д;
 - в) 65 000 Д;
 - г) 90 000 Д.
10. Тетрапиррольная ароматическая структура протопорфирина IX, в состав которого обязательно входит ион Fe^{2+} , называется:
- а) гем;
 - б) глобин;
 - в) билирубин;
 - г) хлорофилл.
11. Какой из представленных цитохромов растворим в воде?
- а) a_1 ;
 - б) a_3 ;
 - в) b;
 - г) c.
12. Молекулярная масса цитохрома C составляет примерно:
- а) 8000 Д;
 - б) 12 000 Д;

- в) 32 000 Д;
- г) 80 000 Д.

13. Число аминокислотных остатков в α -цепи гемоглобина человека составляет:

- а) 141;
- б) 144;
- в) 146;
- г) 152.

14. Число доменов в β -цепи гемоглобина равно:

- а) 6;
- б) 7;
- в) 8;
- г) 9.

15. Тетрамер гемоглобина имеет размер:

- а) 4,5 нм \times 4,5 нм \times 3,0 нм;
- б) 15,0 нм \times 16,5 нм \times 14 нм;
- в) 2,8 нм \times 3 нм \times 2,6 нм;
- г) 6,4 нм \times 5,5 нм \times 5 нм.

16. Изоэлектрическая точка различных типов гемоглобина колеблется в пределах:

- а) 6,3—6,8;
- б) 6,8—7,18;
- в) 7,0—7,6;
- г) 7,4—7,8.

17. Наиболее прочные межмолекулярные взаимодействия имеются между глобулами:

- а) α_1 — β_2 и α_2 — β_1 ;
- б) α_1 — α_1 и β_2 — β_2 ;
- в) α_1 — β_1 и α_2 — β_2 ;
- г) α_1 — α_2 и β_1 — β_2 .

18. Сколько молекул кислорода (O_2) способна связать одна тетрамерная молекула гемоглобина?

- а) 1;
- б) 2;
- в) 3;
- г) 4.

19. Какой из перечисленных типов гемоглобина отсутствует в крови здорового взрослого человека?

- а) HbA₁;
- б) HbA₂;
- в) HbP;
- г) HbF.

20. Как называется производное гемоглобина, образующееся в результате его взаимодействия с угарным газом?

- а) карбоксигемоглобин;
- б) карбгемоглобин;
- в) метгемоглобин;
- г) циангемоглобин.

21. Какой из перечисленных типов гемоглобина относят к патологическим?

- а) HbA₁;
- б) HbS;
- в) HbP;
- г) HbF.

22. Гемоглобину человека A₂ соответствует тетрамерный состав:

- а) 2 α 2 ϵ ;
- б) 2 α 2 γ ;
- в) 2 α 2 δ ;
- г) 2 α 2 β .

23. Гемоглобины Gower-I и Gower-II являются подтипами:

- а) HbA₁;
- б) HbS;
- в) HbP;
- г) HbF.

24. Какой тип гемоглобина является наиболее устойчивым к действию щелочей?

- а) HbA₁;
- б) HbS;
- в) HbP;
- г) HbF.

25. Резистентность к какому заболеванию выражена у больных серповидноклеточной анемией?

- а) туберкулез;
- б) цинга;

- в) малярия;
- г) сонная болезнь.

26. В какой хромосоме локализован α -ген гемоглобина?

- а) 8-я;
- б) 11-я;
- в) 12-я;
- г) 16-я.

27. Ген какой цепи гемоглобина в процессе эволюции возник первым?

- а) α -цепи;
- б) 2ε -цепи;
- в) δ -цепи;
- г) β -цепи;

28. Какой тип гемоглобина является доминирующим на 30-й неделе гестации?

- а) HbA₁;
- б) HbS;
- в) HbF;
- г) HbF.

29. α -талассемия характеризуется:

- а) повышением скорости синтеза α -цепей;
- б) снижением скорости синтеза α -цепей;
- в) повышением скорости утилизации α -цепей;
- г) снижением скорости утилизации α -цепей.

30. Ведущим колориметрическим методом определения концентрации гемоглобина в крови является:

- а) метод Сали;
- б) метод Бетке;
- в) унифицированный гемоглобинцианидный метод;
- г) метод Зингера.

Ответы к учебно-тестовым заданиям

1	б	16	б
2	в	17	в
3	г	18	г
4	б	19	в
5	в	20	а
6	г	21	б
7	б	22	а
8	а	23	в
9	в	24	г
10	а	25	в
11	г	26	г
12	б	27	а
13	а	28	г
14	в	29	б
15	г	30	в

Список литературы

1. Агаджанян, Н. А., Северин, А. Е. Зависимость кислород-транспортной функции крови и резервов кардиореспираторной системы от экологических условий среды обитания // Росс. науч. симп. «Экологические факторы и кроветворение»: тез. докл. — Москва, 1992. — С. 7—8.

2. Агапова, А. Б., Кривенцев, Ю. А., Дьякова, О. Н. Разработка диагностической иммунодиффузионной тест-системы на фетальный гемоглобин // Материалы конференции молодых ученых с международным участием «Белки-маркеры патологических состояний». — Астрахань — Москва, 2001. — С. 101—103.

3. Агапова, А. Б., Никулина, Д. М., Дьякова, О. Н., Кривенцев, Ю. А., Корноухова, И. Ю. Фетальный гемоглобин как тест для диагностики гипоксических состояний // Материалы III съезда биохимического общества РАН. — СПб., 2002. — С. 131.

4. Агапова, А. Б., Никулина, Д. М., Панова, Т. Н. Сравнительная оценка продукции фетального гемоглобина в зависимости от патогенетических механизмов при хронической ишемической болезни сердца и хронической обструктивной болезни легких // Материалы 3-й Научной конференции и школы-семинара для молодых ученых «Белки-маркеры патологических состояний». — Астрахань — Москва. — 2003. — С. 50—56.

5. Асланова, Н. К. Некоторые эритроцитарные показатели у больных хронической гипоксией различного генеза — Клиническая медицина. — 1991. — № 4. — С. 56—58.

6. Березов, Т. Т., Коровкин, Б. Ф. Биологическая химия // М. Медицина. — 1998.

7. Биология. В 2 кн. Кн 1 : учебник для медиц. спец. вузов / В. Н. Ярыгин, В. И. Васильева, И. Н. Волков, В. В. Синельщикова ; под ред. В. Н. Ярыгина. — 2-е изд., испр. — М. : Высшая школа, 1999.

8. Биохимия / под ред. Е. С. Северина. — М. : Издательский дом ГЭОТАР-МЕД. — 2003.

9. Блюменфельд, Л. А. Гемоглобин // Соросовский образовательный журнал. — 1998. — № 4. — С. 33—38.

10. Гипоксия. Адаптация, патогенез, клиника. — СПб. : ЭЛБИ-СПб, 2000.
11. Делекторская, Л. Н., Пименова, Л. М., Кадашева, О. Г. Оценка диагностической информативности лабораторных тестов (методические рекомендации) // Клин. лабораторная диагностика. — 1992. — № 1/2. — С. 49—59.
12. Зайчик, А. Ш., Чурилов, Л. П. Основы патохимии // СПб. : Элби-СПб, 2000.
13. Заяц, Р. Г., Бутвиловский, В. Э., Рачковская, И. В., Давыдов, В. В. Общая и медицинская генетика. Лекции и задачи / Серия «Учебники, учебные пособия» — Ростов н/Д : Феникс, 2002.
14. Иванов, П. А., Никулина, Д. М., Яровая, И. В. Значение сульфгемоглобина как показателя вредных химических воздействий на организм человека // Материалы науч.-технич. семинара «Перспективные подходы к решению проблем экологической безопасности Нижнего Поволжья в связи с разработкой и эксплуатацией нефтегазовых месторождений с высоким содержанием сероводорода». — Астрахань. — 1998. — С. 45.
15. Иржак, Л. И. Гемоглобины и их свойства. — М. : Наука, 1983. — 150 с.
16. Кривенцев, Ю. А., Никулина, Д. М., Бисалиева, Р. А. Иммунохимический анализ концентрации фетального гемоглобина в крови новорожденных мальчиков и девочек с внутриутробной гипоксией // Омский научный вестник. — 2006. — Т. 46, № 9. — С. 272—274.
17. Кривенцев Ю. А., Бисалиева Р. А., Ишмемедова, Л. М., Носков, А. И., Рамазанов, М. В. Новый способ клинической оценки гемоглобинового спектра / // Сибирский медицинский журнал. — Иркутск. — 2011. — Т. 102, № 3. — С. 52—54.
18. Марри, Р., Греннер, Д., Мейес, П., Родуэлл, В. Биохимия человека. В 2 т. — М. : Мир, 1993.
19. Медицинские лабораторные технологии и диагностика / под ред. А. И. Карпищенко. Справочник. — Т. 1. — СПб., 1998.
20. Мутовин, Г. Р. Основы клинической генетики : учеб. пособие для мед. и биол. спец. вузов. — 2-е изд., испр. и доп. — М. : Высшая школа, 2001.
21. Николаев, А. Я. Биологическая химия // М. : Высшая школа. — 2001.
22. Никулина, Д. М., Дьякова, О. Н., Кривенцев, Ю. А., Корноухова, И. Ю., Агапова, А. Б. Фетальный гемоглобин как тест для диагностики гипоксических состояний // Материалы III съезда биохимического общества РАН. — СПб., 2002. — С. 131.

23. Сингер, М., Берг, П. Гены и геномы. В 2 т. : пер. с англ. — М. : Мир, 1998.
24. Шевченко, В. А., Топорнина, Н. А., Стволинская, Н. С. Генетика человека : учебник для студ. высш. учеб. заведений. — М. : Гуманит. изд. центр ВЛАДОС, 2002.
25. Эллиот, В., Эллиот, Д. Биохимия и молекулярная биология — М. : Издательство НИИ Биомедицинской химии РАМН, 2000.
26. Энциклопедия клинических лабораторных тестов / под ред. Н. У. Тица. — М. : Лабинформ, 1997.
27. Boissel, J.-P. R., Wen, D., Bunn, H. F. Erythropoietin: Mammalian Sequences and Scanning Deletions Support a Four Alpha-Helical Bundle Structural Model. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1994, 718. — P. 203—212.
28. De Halleux, V., Truttmann, A., Gagnon, C., Bard, H. The Effect of Blood Transfusion on the Hemoglobin Oxygen Dissociation Curve of Very Early Preterm Infants During the First Week of Life // *Semin Perinatol.* — 2002. — 26(6):411-5.
29. Eckardt, K. U. The Ontogeny of Biological Role and Production Of Erythropoietin. — *J. Perinatal Med.*, 1995. — 23. — P. 19—29.
30. Eichhorn, K. H., Bauer, C., Eckardt, K. U. et al. Lack of Assoc ; I Between Fetal and Maternal Erythropoietin at Birth. — *Eur. J. C : Gynecol. Reprod-Biol.*, 1993. — P. 50, 47—52.
31. Erslev, A. J. Clinical Erythrokinetics: a Critical Review. — *Blood Rev.*, 1997. — 11. — P. 160—167.
32. Erslev, A. J., Soltan, A. Pure Red-Cell Aplasia: a Review. — *Blood Rev.*, 1996. — 10. — P. 20—28.
33. Eschbach, J. W., Haley, H. R., Egrie, J. C., Adamson, J. W. A Comparison of the Responses to Recombinant Human Erythropoietin in Normal and Uremic Subjects. — *Kidney Int.*, 1992. — 42. — P. 407—416.
34. Green, A. R., Lints, T., Visvader J. et al. SCL is Coexpressed with GATA-1 in Hematopoietic Cells but is Also Expressed in Developing Brain. — *Oncogene*, 1992. — 7. — P. 653—660.
35. Hoidal, J. R., Jeffery, P. K. Cellular and Biochemical Mechanisms in Chronic Obstructive Pulmonary Disease // *Im Management of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* / Eds: D. S. Postma, N. M. Siafakas. The European Respiratory Society Monograph, 7 May, 1998. — 1. — P. 302.
36. Huch, R., Huch, A. Maternal and Fetal Erythropoietin: Physiological Aspects and Clinical Significance. — *Ann. Med.*, 1993. — 25. — P. 289—293.