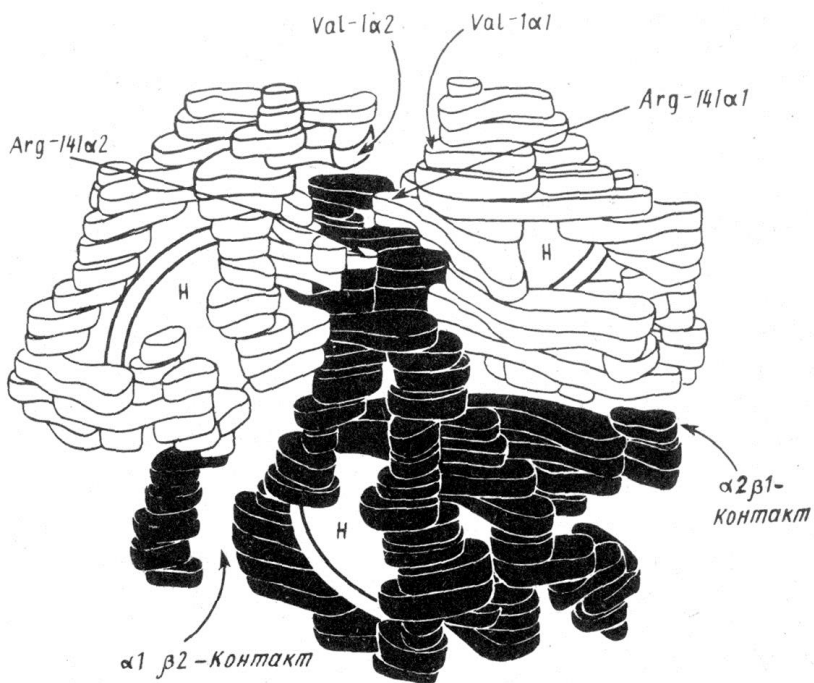


Н. Б. Пількевич, В. М. Раздайбедін,  
О. Д. Боярчук

# ГЕМОГЛОБІН: структура, біохімія та патологія



**Міністерство освіти і науки України  
Луганський національний педагогічний університет  
імені Тараса Шевченка**

Кафедра анатомії, фізіології людини  
та тварин

**Н. Б. Пількевич, В. М. Раздайбедін,  
О. Д. Боярчук**

# **ГЕМОГЛОБІН: структура, біохімія та патологія**

***НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК***

**Луганськ  
«Альма-матер»**

**2007**

**УДК [611.36+612.35](075.8)**

**ББК 28.706я7+28.707я7**

**П 32**

**Рецензенти:**

**І.О. Іванюра** – доктор біологічних наук, професор кафедри анатомії, фізіології людини та тварин Луганського національного педагогічного університету імені Тараса Шевченка

**Р.П. Ткачов** - кандидат хімічних наук, доцент кафедри хімії Луганського національного педагогічного університету імені Тараса Шевченка

**П 32 Пількевич Н.Б., Раздайбедін В.М., Боярчук О.Д. Гемоглобін: структура, біохімія та патологія: Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів. – Луганськ: Альма-матер, 2007. – 90 с.**

У цьому навчальному посібнику викладаються основні дані, які характеризують структуру та властивості гемоглобіну, основні функції гемоглобіну та методи його функціонального дослідження. Навчальний посібник адресується студентам, що вивчають дисципліни біологічного напрямку.

**УДК [611.36+612.35](075.8)**

**ББК 28. 706я7+28.707я7**

*Рекомендовано до друку Вченою радою Луганського національного педагогічного університету імені Тараса Шевченка;  
(протокол № 9 від 16 травня 2007 року)*

Колектив авторів, 2007  
Альма-матер, 2007

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕДМОВА.....</b>	<b>5</b>
<b>РОЗДІЛ 1. СТРУКТУРА ГЕМОГЛОБІНУ.....</b>	<b>7</b>
Історія вивчення природи гемоглобіну.....	7
Хімічний склад і будова гемоглобіну.....	11
Гем.....	11
Глобін.....	18
Структура гемоглобіну.....	20
Множинність гемоглобінів.....	23
<b>ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОГО КОНТРОЛЮ.....</b>	<b>26</b>
<b>РОЗДІЛ 2. ФІЗІОЛОГІЯ ГЕМОГЛОБІНУ.....</b>	<b>28</b>
Роль гемоглобіну в транспорті вуглекислоти.....	31
Ембріональне кровотворення.....	36
Біосинтез гемоглобіну.....	40
Деструкція гемоглобіну.....	47
Фактори, які визначають продукцію гемоглобіну та його деструкцію.....	50
Обмін заліза.....	53
Вікові особливості вмісту гемоглобіну.....	62
<b>ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОГО КОНТРОЛЮ.....</b>	<b>63</b>
<b>РОЗДІЛ 3. ПАТОЛОГІЇ ОБМІНУ ГЕМОГЛОБІНУ.....</b>	<b>65</b>
<b>ТЕСТОВІ ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОГО КОНТРОЛЮ.....</b>	<b>69</b>

<b>ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ.....</b>	<b>73</b>
Методи визначення гемоглобіну.....	73
Лабораторна робота №1. <i>Визначення гемоглобіну за Салі</i> .....	78
Лабораторна робота №2. <i>Визначення гемоглобіну на фотоелектроколориметрі</i> .....	80
Лабораторна робота №3. <i>Визначення кількості еритроцитів і кольорового показника крові</i> .....	81
Лабораторна робота №4. <i>Визначення осмотичної резистентності еритроцитів</i> .....	82
<b>ЛІТЕРАТУРА.....</b>	<b>85</b>
<b>ПРЕДМЕТНИЙ ПОКАЖЧИК.....</b>	<b>86</b>
<b>ВІДПОВІДІ ДО ТЕСТОВИХ ПИТАНЬ .....</b>	<b>88</b>

## ПЕРЕДМОВА

Гемоглобін має найважливіше біологічне значення як найбільш широко розповсюджений серед сучасних тварин дихальний пігмент, що має унікальні властивості, пов'язані із транспортом кисню і вуглекислоти.

Саме ця видатна роль гемоглобіну й стала причиною підвищеного інтересу з боку дослідників різних профілів, внаслідок чого гемоглобін виявився одним з найбільш вивчених пігментів.

Кістяк хребетних служить не тільки системою важелів для пересування тварини і каркасом, що визначає форму організму, захищає найбільш ніжні органи. Насамперед, він є потужним місцем синтезу гемоглобіну, речовини, що визначає, в остаточному підсумку, всю енергетику організму.

Кістковий мозок, що є органічною складовою частиною кістяка, у якій здійснюється біосинтез гемоглобіну, є надбання наземних хребетних тварин, являючи собою одне з найважливіших пристосувань для подолання сил гравітації. Максимального розвитку кістковий мозок досяг у вищих представників хребетних.

Останнє десятиліття характеризується бурхливим розвитком молекулярної біології й генетики, що дозволяє переглянути ряд істотних уявлень у патології. Яскравим прикладом хвороб системи крові є гемоглобінопатії, при яких відбувається зміна будови глобінових ланцюгів, пов'язана з порушенням структури дезоксирибонуклеїнових кислот, а також залізодефіцитні анемії. Тривалий дефіцит заліза приводить до зниження синтезу гемоглобіну, нагромадженню вільного протопорфірину в еритроцитах та розвитку анемії.

Все зазначене вище диктує необхідність більш глибокого й всебічного вивчення молекулярно-генетичних аспектів природи гемоглобіну.

Матеріали навчального посібника викладаються як окрема тема у курсі «Регуляція процесів метаболізму», на

яку заплановано: лекцій – 6 годин, лабораторних робіт – 8 годин, та самостійної роботи 12 годин.

Лабораторний практикум, який містить навчальний посібник, допоможе більш детально підготуватись до лабораторних занять, отримати спеціалізовані вміння та навички.

Завдяки тестам та практичним завданням студенти зможуть самостійно оцінити рівень одержаних знань.

Безсумнівно велике значення навчальний посібник буде мати при виконанні студентами самостійної роботи.

# РОЗДІЛ 1. СТРУКТУРА ГЕМОГЛОБІНУ

## ІСТОРІЯ ВИВЧЕННЯ ПРИРОДИ ГЕМОГЛОБІНУ

Уже понад сто років гемоглобін крові є об'єктом вивчення численних дослідників, внаслідок чого його можна віднести до категорії найбільш вивчених білків. Такий інтерес до гемоглобіну стає зрозумілим, якщо взяти до уваги величезне біологічне значення його як дихального пігменту, що забезпечує організм киснем. Наявність заліза в складній молекулі гемоглобіну є однією з головних умов, що визначають чудову властивість цього пігменту зв'язувати кисень там, де його багато, і звільняти там, де його мало.

Уперше наявність заліза в крові було встановлено ще Менгіні в 1747 році. Л. Мороховець (1892) у монографії «Єдність протеїнових тіл» наводить деякі дані, що стосуються історії дослідження гемоглобіну. Так, в 1830 р. Леканю (Lesau) повідомив Паризькій академії наук про те, що фарба крові, яку він назвав зоогематином, при хімічній обробці розпадається на альбумін і нову фарбу, що містить у своєму складі залізо – глобулін. Берцеліус (Berzelius, 1831) показав, що якщо альбумін Леканю є білком, то речовина, яку він назвав глобуліном, являє собою гематин. Грунтуючись на цих даних, Симон (Simon, 1838) назвав цю сполуку гематоглобуліном. Ф. Гоппе-Зейлер (Hoppe-Seyler, 1864) дав цьому пігменту назву гемоглобін, щоб уникнути плутанини, тому що цей пігмент крові називали всілякими термінами (гематин, гематоглобулін, барвник крові, багрянець крові та ін.).

Відомо, що вивчення хімічного складу й будови речовини значно полегшується, якщо ця речовина перебуває в кристалічному стані, тому що в цьому випадку можна виділити її в найбільш чистому виді, без домішок, що сильно заважають дослідженню. Відомо також, що серед білків є група так званих волокнистих білків, або склероп-



ротейнів, не здатних кристалізуватися, тоді як, так звані нативні, корпускулярні білки, мають здатність кристалізуватися, давати білкові кристали. Гемоглобін крові належить до числа таких білків, які відносно легко кристалізуються. Цікаво у зв'язку із цим відзначити, що гемоглобін був першим білком тваринного походження, який вдалося одержати в кристалічному вигляді.

Здатність крові утворювати кристали вперше була виявлена Р. Гюнефельдом (Hunefeld) в 1839 р. при вивченні краплі підсихаючої крові дощового хробака. Пізніше О. Функе (Funke, 1852) розробив метод кристалізації крові, виділивши, таким чином, гемоглобін у вигляді кристалів.

Приблизно в цей же час Людовік Тейхман (Teichman, 1853), згодом професор Краківського університету, при нагріванні грудок висохлої крові із крижаною оцтовою кислотою в присутності хлористого натрію вперше помітив утворення кристалів геміну. Правда, у першому своєму повідомленні Л. Тейхман припускав, що він мав справу з деякою видозміною гемоглобіну, але вже в наступному повідомленні він, виправляючи помилку, відзначає, що його продукт не містить білка. Спосіб Тейхмана дотепер є однією з основних якісних проб на кров при судово-медичних дослідженнях для встановлення наявності крові в підозрілих плямах.

Одержання барвника крові у вигляді кристалів стало найважливішим етапом у вивченні природи гемоглобіну, оскільки при цьому методі одержання кристалів геміну гемоглобін розділяється на білкову частину (глобін) і барвну частину у вигляді геміну - солянокислої солі гема (або гематину за тодішньою термінологією). Таким чином, з'являлась можливість детального вивчення структури геміну як речовини кристалічної й, отже, хімічно чистої, однорідної за складом.

Однак при цьому залишалось ще основне утруднення, пов'язане з тим, що метод Тейхмана давав дуже обмежений вихід кристалів геміну, явно недостатній для хімічного аналізу структури цієї речовини.

В 1866 р. нашим співвітчизником І.Гвоздьовим був розроблений кількісний метод одержання кристалів геміну. За цим методом кристали геміну розчинялися в алкоголі (93%), що відстоювався над поташем. У такому алкоголі гемін розчиняється дуже легко; з розчину пігмент осаджувався оцтовою кислотою, фільтрувався і потім нагрівався з міцною оцтовою кислотою. При охолодженні з розчину випадали кристали геміну. Цей метод був застосований у лабораторії Ф. Гоппе-Зейлера, який зробив хімічне дослідження кристалів геміну (Hoppe-Seyley, 1866). На підставі численних аналізів він запропонував такі формули геміну й гематину:  $C_{68}H_{70}O_{10}N_8Fe_2 \times 2HCl$  і  $C_{68}H_{70}O_{10}N_8Fe_2$ .

Відомий біохімік М. В. Ненцький і Н. Зібер в 1884 р. запропонували новий метод виділення кристалів геміну за допомогою амілового спирту. Цей метод дозволяв одержувати до 1,5 г геміну з одного літра крові. Емпірична формула геміну, згідно з М.В. Ненцьким та Н. Зібера, виявилася такою:  $C_{32}H_{31}O_3N_4FeCl$ .

Аналізуючи кристали геміну із крові людини, коня, бика, свині, вони знайшли, що у всіх випадках склад їх такий самий.

Гематин, який одержували розчиненням геміну в слабкому лузі та осадженням барвника кислотами, за даними цих авторів, має склад  $C_{32}H_{32}O_4N_4Fe$ , тобто хлор замінюється гідроксидом.

Завдяки цим дослідженням М. В. Ненцького і його співробітників вивчення хімічної природи геміну було поставлено на твердий ґрунт.

В 1885 р. у лабораторії медичної хімії Варшавського університету професором М. Шалфесвим був розроблений інший спрощений метод, який усував попередню обробку крові, за допомогою якого можна було одержати від 5,2 до 5,6 г кристалічного геміну з одного літра крові, що відповідало 85,0-90,0% теоретичного виходу. Автор при цьому виходив з того, що вміст гемоглобіну в крові дорівнював 12%, а вміст заліза – 0,43%; і, отже, у літрі крові міститься 120 г гемоглобіну та 0,516 г заліза. Якщо залізо цілком пе-

реходить у гемін, то 0,516 г заліза буде відповідати 6,2 г геміну.

Професор мінералогії Варшавського університету А. Е. Лагоріо тоді ж зробив аналіз кристалів геміну, отриманих за методом М. Шалфєєва, і встановив, що це кристали триклинної системи, що мають 0,1 мм довжини й 0,02 мм ширини, але іноді досягають 0,16 мм довжини й 0,017 мм ширини і володіють дуже сильним плеохроїзмом.

Метод одержання кристалічного геміну, запропонований М. Шалфєєвим, одержав широке розповсюдження, і професор М.В. Ненцький та його співробітники вже в період роботи в Інституті експериментальної медицини в Петербурзі (1891-1901) користувалися цим методом, зробивши в ньому деякі зміни. Зокрема, вони застосували повторну кристалізацію, завдяки чому видалялися випадкові домішки (Ненцький і Залесьський, 1900).

М. Бялобржеський (1897) - один з учнів М.В. Ненцького - свою дисертацію присвятив порівняльному вивченню складу та хімічних властивостей препаратів геміну, отриманих різними методами.

У результаті багаторазово проведених аналізів геміну, отриманих із крові за допомогою оцтової кислоти шляхом повторної кристалізації, М.В. Ненцький і М. Залесьський показали, що кристали геміну зовсім вільні від домішок. Ці кристали не розчинні у воді, мало розчинні в спирті й легко розчиняються в слабких лугах.

Елементарний аналіз перекристалізованого, вільного від домішок геміну дав такі середні результати:

C = 62,51%, H = 5,36%; N = 8,63%, Cl = 5,49%; Fe = 8,69%.

Ці числа найбільше відповідають формулі  $C_{34}H_{33}O_4N_4FeCl$ , що вимагає:

C = 62,53%; H = 5,06%; N = 8,59%; Cl = 5,44%; Fe = 8,59%.

«Цей гемін характеризується своєрідною формою кристалів: тонкі, загострені ромбічні пластинки триклинної системи, що досить сильно відбивають світло, з кутом загасання світла близько 30—36°» (Залесьський, 1916).

М. Залесський, який проводив цю роботу разом з М. В. Ненцьким, уже в 1902 р. дав таку остаточну емпіричну формулу геміну:  $C_{34}H_{32}O_4N_4FeCl$ . Ця формула була прийнята потім і іншими дослідниками. Зокрема, В. Кюстер (Kuster, 1920) у своїх роботах, ґрунтуючись на численних аналізах геміну, проведених ним, не вніс яких би те не було виправлень. Також прийняли цю формулу О. Пілоті (Piloty, 1910) і Г.Фішер (Fischer a. oth., 1914) і тільки Р. Вільштеттер (Willstatter, 1913) продовжував вважати, що гемін містить 33 атоми вуглецю.

Остаточного питання про правильність емпіричної формули геміну могло бути вирішене тільки при штучному синтезі геміну.

## **ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА БУДОВА ГЕМОГЛОБІНУ**

Складні білки, або протеїди, як відомо, характеризуються тим, що до їх складу, крім білкової частини, входить та або інша небілкова частина, яку називають простетичною групою (грецьк. prosthoto - приєдную, додаю). Серед протеїдів виділяється особлива група складних білків, які називають хромопротеїдами, характерною рисою яких є наявність забарвленої простетичної групи, звідки й виникла сама назва (грецьк. chroma - фарба). Одним з найважливіших хромопротеїдів є дихальний пігмент крові - гемоглобін, у складі якого, крім безбарвної білкової частини - глобіну, міститься забарвлена простетична група, інакше називана гемом.

Особливість гема полягає в тому, що він включає метал - залізо. За своєю структурою гем є металопорфірином. Металопорфіринові комплекси входять до складу ряду дихальних пігментів, широко розповсюджених в організмах тварин і рослин.

### **Г Е М**

М. Ансон і А. Мирський (1925) запропонували назвати небілкову частину гемоглобіну спеціальним терміном «гем», а його солянокислу сполуку - «гемін». Вони підк-

реслюють, що гемохромоген, отриманий при впливі слабких кислот або лугів на гемоглобін, не є відновленою формою гематину. При доступі кисню він не може перетворитися в гематин, як вважали колись, тому що являє собою більш складну комплексну сполуку, яка містить білок. Вони відзначають також, що введення в гем азотистої сполуки, починаючи з аміаку, істотно змінює його властивості, що легко виявляється при спектральному аналізі. При цьому утворюється нова сполука, яку вони назвали гемохромоген. Аналогічні сполуки виходять при з'єднанні гема з піридином, ніотином.

Гемохромоген має певні властивості, що відрізняє його від всіх інших продуктів розщеплення гемоглобіну та від самого гемоглобіну. Ці властивості залежать від сполук, які містять азот. Спектроскопічні похідні гемоглобіну, що мають склад  $C_{34}H_{30}N_4O_4Fe$ , відповідають назві гемохромоген з характерним спектром тільки в тому випадку, якщо в їхньому складі є азотиста сполука або домішка білка. При існуючому колись хімічному аналізі гемохромоген, який одержували гідролітичним шляхом, завжди мав домішку денатурованого білка.

При повному видаленні білка або одержанні речовини складу  $C_{34}H_{30}N_4O_4Fe$  із кристалів геміну, спектр гемохромогена відсутній. Додавання  $NH_3$  в останньому випадку дає спектр гемохромогена, але зрушений на 20А вправо в порівнянні з а-смугою гемохромогена, утвореного за рахунок денатурованого глобіну.

М. Фішер, А.Трейбс і Г. Зейле в 1931 р. писали, що на підставі отриманих результатів дослідження комплексну сіль із двовалентним залізом вони позначають як «гем». У примітці вони вказували, що термін «гем» введений М.Ансоном і А.Мирським, так само як і Д.Кейліним, для позначення пірролового компонента в гемоглобіні —  $C_{34}H_{32}N_4O_4Fe$ .

Гемін як гідрохлорид гема відповідає формулі  $C_{34}H_{33}N_4O_4FeCl$ .

Питання, що стосуються термінології стосовно такого важливого дихального пігменту, як гемоглобін і його де-

ривати, піддавалися критичному розгляду й пізніше. І це не випадково, тому що плутанина в термінах затруднює використання даних, одержуваних тим або іншим дослідником. Особливо гостро це питання стало у зв'язку з розширенням наших знань про будову гемоглобіну й родинних йому речовин, завдяки застосуванню нових точних фізичних методів дослідження, таких, як спектрофотометричні, магнетохімічні й ін. Таким чином, виникла необхідність у розробці нової номенклатури, більш простої та логічної, ніж звичайно вживана.

Гем: залізопорфіринівий комплекс; залізо може бути закисним ( $Fe^{II}$ ) і окисним ( $Fe^{III}$ ).

Ферогем: комплекс закисного заліза ( $Fe^{II}$ ) з порфірином (відновлений гем).

Феригем: комплекс окисного заліза ( $Fe^{III}$ ) з порфірином (окислений гем).

Феригем хлорид, гемін: сполука феригему та іона хлору ( $Cl^-$ ).

Феригем гідроксид, гематин: сполука феригема та іона гідроксилу ( $OH^-$ ).

Ферогемохромогем, гемохромоген: комплекс ферогема й іншої речовини або двох інших речовин, які мають характерний спектр гемохромогена та які мають ковалентні зв'язки від атома заліза до атома азоту порфірину та приєднаних груп. Гемохромогени називають за назвою другого компонента комплексу, як, наприклад, глобін гемохромоген (ферогем і денатурований глобін), диціанідгемохромоген, дипіридингемохромоген, карбонмонооксигемохромоген, піридинкарбоксигемо-хромоген і т. буд.

Феригемохромоген (парагематин): сполука феригема та іншої речовини або двох інших речовин, зв'язаних ковалентно від атома заліза до атома азоту порфірину та приєднаних груп.

Гемоглобін: складний білок, що містить гем і нативний глобін. Ферогемоглобін.

Оксигемоглобін: сполука ферогемоглобіну з киснем.

Карбоксигемоглобін: сполука ферогемоглобіну з окисом вуглецю.

Феригемоглобін: складний білок, утворений сполукою феригема й нативного глобіну.

**Структура гема.** Питання, що стосуються структури гемоглобіну, у першу чергу його простетичної групи - гема, були предметом інтенсивного вивчення протягом другої половини ХІХ і перших трьох десятиліть минулого сторіччя. Найбільш детальному вивченню був підданий гемін як сполука, яку легко отримати у кристалічному виді.

У справі вивчення структури геміну видатна роль належить М. В. Ненцькому.

Відомо, що з гемоглобіну, геміну та гематину під дією міцних кислот відщепляється залізо. У результаті відщеплення заліза виходить речовина, яка забарвлена в інтенсивний яскраво-червоний колір з характерним спектром поглинання. Ці речовини були названі порфіринами (від грецьк. порфірсос — пурпурний). Гематопорфірин, мало розчинний у воді, легше в слабких кислотах і дуже легко в лугах; його формула —  $C_{68}H_{74}O_{12}N_8$ .

При обробці геміну крижаною оцтовою кислотою, насиченою бромистим воднем, була отримана значна кількість гематопорфірину, який дає особливо легко кристалічну сполуку із  $HC1$ , так званий солянокислий гематопорфірин. Формула гематопорфірину:  $C_{16}H_{18}O_3 N_2HC1$ .

Ця формула гематопорфірину була піддана перегляду після відкриття порфірину крові — мезопорфірину, для якого більш точно були встановлені емпіричні формули й молекулярна вага.

Вивчаючи похідні зеленого пігменту рослин хлорофілу, було встановлено, що при нагріванні з лугами різних похідних хлорофілу виходить червоний барвник, який було названо філопорфірином. Аналіз показав, що його склад відповідає формулі  $C_{16}H_{18}ON_2$  і за своїми хімічними властивостями він близький до гематопорфірину. Таким чином, ці дані вперше довели споріднення між двома найважливішими пігментами органічного миру гемоглобіном і

хлорофілом, тому що філопорфірин (похідне хлорофілу) за складом і властивостями дуже близький до гематопорфірину, похідного гемоглобіну крові.

Мезопорфірин (інший порфірин крові) був отриманий шляхом впливу на гемін сумішшю оцтової кислоти і йодистоводневої кислоти з додаванням під час реакції йодистого фосфонію ( $\text{PH}_4\text{J}$ ).

Аналіз перших проб кристалів солянокислого мезопорфірину показав, що він має сполуку  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{PRO}_2\text{N}_2\text{HCl}$ . Однак подальші досліди із тричі й чотири рази перекристалізованим мезопорфірином показали, що більш правильною є формула  $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{O}_4\text{N}_4\text{2HCl}$ .

Молекулярна вага мезопорфірину, яку встановили за зниженням точки замерзання розчину у фенолі, виявилася рівною 566. Саме ці дані послужили підставою для встановлення остаточної формули мезопорфірину  $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{O}_4\text{N}_4$ .

Оскільки мезопорфірин є більш видозміненим продуктом, ніж гематопорфірин і оскільки його можна одержати з гематопорфірину, тоді як зворотний перехід не вдавався, постільки все це послужило підставою для прийняття іншої формули і для солянокислого гематопорфірину, саме  $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{O}_6\text{N}_6\text{2HCl}$ , і для вільного гематопорфірину  $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{O}_6\text{N}_4$ .

**Порфірини.** При гідролізі хлорофілу виходять продукти розщеплення у вигляді одноосновних кислот, що містять магній - філофіліни й пірофіліни. Всі філіни при дії кислот заміняють магній воднем, даючи початок ряду порфіринів з тими ж назвами.

При нагріванні філінів або порфіринів із хлорофілу з натронним вапном до  $240^\circ$  втрачається останній карбоксил і виходить речовина, що не містить кисню, — етиофілін  $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{Mg}$ ; при дії кислот етиофілін перетворюється в етиопорфірин  $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{N}_4$ .

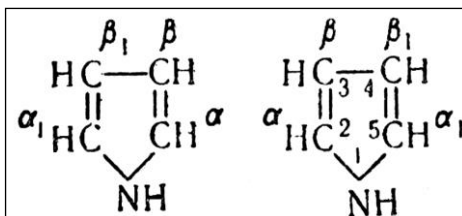
При нагріванні гематопорфірину в автоклаві до  $190^\circ$  з  $\text{MgO}$  і  $\text{KOH}$  у присутності метилового спирту й піридину був отриманий продукт, що після нагрівання з натронним вапном перетворюється в речовину такого ж складу, що й у результаті обробки філінів.



Для нових речовин були запропоновані назви «етиопорфірин і етиофілін» (від грецьк. айтіа - основа), вважаючи їх вихідними, материнськими тілами всіх інших порфіринів і філінів. Таким чином, два найважливіших пігменти органічної природи мають загальну основу, будучи похідними етиопорфірину.

Установлено, що при далекому розпаді гемоглобіну і хлорофілу виходять кінцеві продукти у вигляді гомологів піролу (мал.1).

Наявність похідних піролу в геміні було виявлено при сухій перегонці геміну. При редукції геміну оловом у присутності HCl досягається повне знебарвлення розчину; у цьому розчині можна констатувати наявність речовин з основним характером, що дають реакцію із сосною скалочкою, змоченою соляною кислотою, тобто таких, що належать до групи піролу. У молекулі геміну встановлено чотири атоми кисню, які входять до складу двох COOH-груп, і чотири атоми азоту, що перебувають у чотирьох піролових ядрах. Крім того, при більш енергійному відновленні геміну одержали речовину, названу гемопіролом.



Мал.1 Пірол

При розщепленні геміну шляхом відновлення був отриманий ряд гомологів піролу, що мають характер основи:

- гемопірол (2, 3-диметил-4-етилпірол),
- криптопірол (3,5-диметил-4-етилпірол),
- філопірол (2,3,5-триметил-4-етилпірол)
- оксипірол (3-метил-4-етилпірол).

Крім того, у продуктах розщеплення геміну і порфіринів при реакціях відновлення був отриманий ряд похідних піролу з карбоксилем у бічному ланцюзі, які мають кислотні властивості. Це так звані гемопіролові кислоти: гемо-

пірол-, криптопірол-, філопірол-, оксипірол- карбонові кислоти.

При розщепленні геміну шляхом окислювання отриманий ряд продуктів, таких, як гематинова кислота, метилетилмалеїнімід та ін.

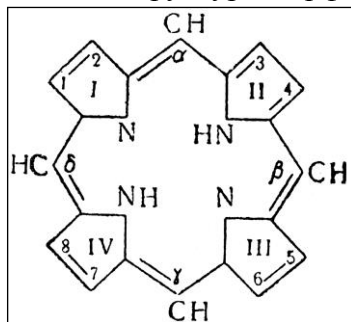
Кількісний аналіз продуктів розпаду геміну показав, що двом основним піроловим залишкам відповідають два кислотних залишки. Серед продуктів розпаду не було знайдено сполук, що складаються із двох піролових ядер, однак їх удалося виділити з родинних геміну жовчних пігментів і одержати синтетично у вигляді дипірилметену, з'єднаних метиновим містком. Розмаїтість ізомерів піролу, знайдених у продуктах розщеплення геміну, пояснюється тим, що при дії агентів, які редукують, розщеплення може відбуватися в різних частинах метанового містка, внаслідок чого СН<sub>3</sub>-група може бути або в α- або в α<sub>1</sub> положенні.

Конденсація піролів з мурашиним альдегідом приводить до утворення дипірилметану за рахунок вуглецю мурашиного альдегіду.

При окислюванні хлорним залізом дипірилметан перетворюється в забарвлений дипірилметен, що характеризується наявністю метинового містка (=СН-), який зв'язує піроли.

Замкнена структура із чотирьох пірольних кілець, з'єднаних між собою чотирма метановими зв'язками, становить ядро порфіну, що лежить в основі структури порфіринів (мал.2).

У порфіні водневі атоми відповідно до місць р-заступників у піролі нумеруються порядковими номерами від 1 до 8. Метиновий місток, розташований між I і II піролами, носить назву альфа, інші позначаються наступними буквами грецького алфавіту.



Мал.2 Порфін

Порфірин був синтезований

шляхом автоконденсації пірол-а-альдегіду з форміловою кислотою й спиртом і піролу з формальдегідом.

Кожен порфірин відрізняється природою своїх бічних ланцюгів, причому можливе існування декількох ізомерів внаслідок різного розташування бічних ланцюгів. Так, при наявності двох сортів заступників (чотири СН<sub>3</sub>- і чотири С<sub>2</sub>Н<sub>5</sub>-групи), якими заміщаються вісім вільних воднів порфірину, виходять чотири ізомери етиопорфірину.

З метою спрощеного зображення структури формул різних порфіринів був уведений спеціальний символ для порфіну, що дає уявлення про розміщення восьми воднів у р-положенні чотирьох ядер піролу або про положення відповідних бічних ланцюгів при утворенні порфіринів.

Чотири кути відповідають чотирьом азотам піролових кілець, інші чотири - чотирьом метиновим місткам між піроловими кільцями. Вісім заступників у р-положенні піролових кілець зв'язані пунктирними лініями з вуглецевими атомами центрального кільця, від якого вони відділені р-карбонними атомами піролових кілець.

В етиопорфірині беруть участь тільки два β-заступники - етил і метил, і вони утворюють чотири ізомери, інші ж порфірини, як наприклад протопорфірин, мають три види β-заступників - вініл, метил і пропіоновий залишок, внаслідок чого число можливих ізомерів збільшується до п'ятнадцяти. Протопорфірин може перейти в мезопорфірин при перетворенні вінільних груп в етильні. Число теоретично можливих ізомерів мезопорфірину також дорівнює 15, з яких 12 отримані синтетично.

## ГЛОБІН

Хімічна природа гема завдяки зусиллям багатьох дослідників була повністю розшифрована і завершилася синтезом його в штучних умовах. Глобін користувався не меншою увагою дослідників, і якщо це питання не одержало ще свого вирішення, те це пояснюється, звичайно, незмірно більш складною структурою його як представника білків - найбільш складних речовин, що зустрічаються в природі.

Чудова здатність гемоглобіну зв'язувати лабільно кисень визначається, звичайно, не тільки властивостями гема. Відомо, що порфірини не належать до категорії речовин, що окисляються легко. Серед цілого ряду металопорфіринів лише три з них здатні до реакцій окислювання і відновлення - це порфірини заліза, кобальту та марганцю. Однак їм не властива здатність з'єднуватися лабільно з киснем. Чудово ще й те, що із цих трьох металопорфіринів лише залізопорфін може з'єднуватися з білком. Ще раніше було відомо, що гем може з'єднуватися із цілим рядом речовин, утворюючи з ними групу гемохромогенів, відмінною рисою яких є наявність сполук, які містять азот.

Були отримані гемохромогени за допомогою впливу відновленого гема на аміак, гідразин, піридин, піперидин, нікотин, глікокол, альбумін і денатурований глобін. Однак жоден із цих гемохромогенів не в змозі давати лабільної сполуки з киснем. Тільки гемоглобін крові або гем, з'єднаний з нативним глобіном, має здатність зворотно зв'язувати кисень. Отже, таку здатність надає гему тільки глобін.

Гемоглобін володіє ще однією важливою особливістю, що має велике значення, а саме – високою розчинністю. Відомо, що концентрація гемоглобіну в крові багатьох тварин становить від 10 до 25, а в еритроцитах від 30 до 45%. Ця обставина має найважливіше біологічне значення, тому що здатність крові зв'язувати кисень при цьому різко збільшується. Але разом з цим відомо, що гем являє собою речовину дуже мало розчинну, так само як і більшість утворених ним гемохромогенів. Лише деякі гемохромогени легко розчинні. Сполука гема із глобіном займає щодо цього зовсім особливе місце.

Висока розчинність гемоглобіну, що має значення не тільки для підвищення кисневої ємності крові, але й для збільшення буферної ємності крові, безсумнівно обумовлена білковою частиною гемоглобіну - глобіном.

Видові властивості гемоглобінів крові різних тварин (різна форма кристалів, спорідненість гемоглобіну до кисню та ін.) також визначаються особливостями глобіну, то-

му що геми всіх досліджених гемоглобінів виявилися ідентичними. Щодо цього становлять інтерес досліди із заміщення простетичної групи гемоглобіну крові й м'язового гемоглобіну.

## СТРУКТУРА ГЕМОГЛОБІНУ

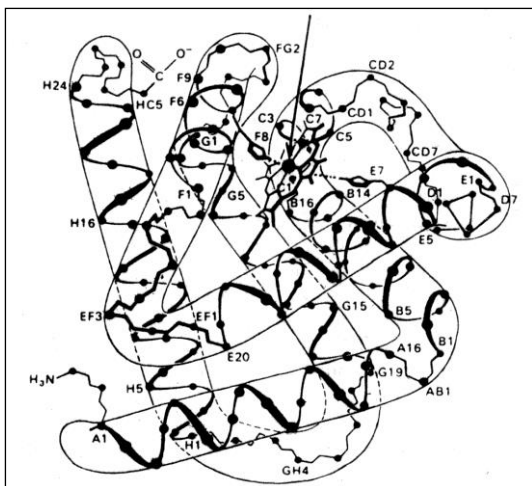
Уперше в дослідах було визначене співвідношення гема й білкової частини в молекулі гемоглобіну коня. Згідно із цими визначеннями, на частку гема доводиться всього лише близько 4,0% молекули, тоді як на частку глобіну – близько 96,0%.

Розміри молекули гемоглобіну крові людини характеризуються висотою 45-50 А та шириною 55-65 А. Для порівняння можна відзначити, що розміри молекули гемоцианіну в багато разів перевершують розміри молекули гемоглобіну, досягаючи 1140 А довжини і 570 А ширини. Цікаво, що електронний мікроскоп при збільшенні в 100000 разів дозволяє бачити окремі молекули гемоглобіну, які, як виявилось, не мають точної еліптичної або сферичної форми, а мають поглиблення на поверхні центральної ділянки завширшки 10-16 А.

Рентгеноструктурний аналіз дав можливість установити просторове розташування поліпептидних ланцюгів і гема в молекулі гемоглобіну (мал.3).

Просторове розташування поліпептидних ланцюгів виявилось найвищою мірою складним. Для характеристики особливостей будови білкової молекули на різних рівнях складності запропоновані відповідні терміни:

- нижчий рівень, що характеризує послідовність розташування амінокислот у поліпептидних ланцюгах, називають первинною структурою молекули білка,
- наступний рівень (просторова конфігурація поліпептидних ланцюгів) - вторинна структура,
- просторове розташування спіралізованих поліпептидних ланцюгів у тривимірному просторі називають третинною структурою молекули білка.



**Мал.3 Просторова структура молекули гемоглобіну**

Молекула гемоглобіну в цілому утворюється із чотирьох субодиниць, кожна з яких являє собою одиничний поліпептидний ланцюг із приєднаним гемом і визначає четвертинну структуру молекули гемоглобіну.

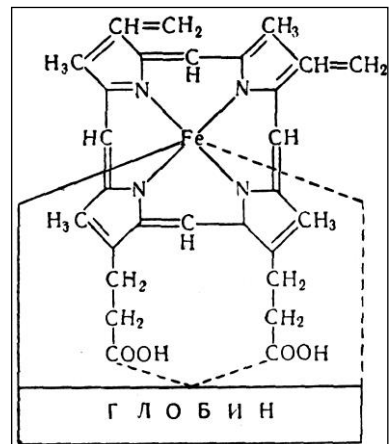
Недостатньо ясне питання про форму зв'язку гема і глобіну, з одного боку, і гемоглобіну з киснем — з іншого. Довгий час вважалося, що молекула гемоглобіну містить один гем. Обґрунтовувалося це уявлення даними щодо визначення молекулярної ваги гемоглобіну по залізу, яка виявилася рівною 17 000. Однак визначення молекулярної ваги гемоглобіну іншими методами — за величиною осмотичного тиску, швидкістю дифузії, константою седиментації — показало, що ця вага дорівнює 68000, тобто в чотири рази перевищує молекулярну вагу гемоглобіну, визначену по залізу. Виходячи із цих даних, був зроблений висновок, що молекула гемоглобіну містить не один, а чотири гери. Оскільки кожний гем має здатність приєднувати одну молекулу кисню, постільки молекула нативного гемоглобіну зв'язує чотири молекули кисню; тому

правильно буде позначати оксигемоглобін не у вигляді  $\text{HbO}_2$ , а у вигляді  $\text{Hb}_4(\text{O}_2)_4$  або  $\text{Hb}_4\text{O}_8$ .

У зв'язку із цим виникає питання про локалізацію гемів у молекулі гемоглобіну й про конкретні форми зв'язку їх із глобіном і киснем (мал.4). Безперечне положення про те, що чудова здатність гемоглобіну зворотно зв'язувати кисень визначається особливостями всієї структури молекули гемоглобіну в цілому, але саме тому важливо знати роль окремих частин цієї молекули. Безсумнівно, що однією з найважливіших особливостей структури молекули гемоглобіну є здатність зв'язувати кисень без зміни валентності заліза, яке при оксигенації і деоксигенації залишається в закисній (двовалентній) формі, що свідчить про наявність змішаних іонно-ковалентних зв'язків між гемом і глобіном.

З даних рентгеноструктурного аналізу відомо, що геми мають форму пласких дисків діаметром 15 А та товщиною 3,7 А. Вважається, що геми розташовані на поверхні молекули глобіну паралельно один одному, причому два геми розташовані на проксимальній і два - на дистальній поверхні глобіну.

Підтверджують це дані про дисоціацію молекули гемоглобіну на дві частини при поміщенні в розчин сечовини, причому кожна половина має молекулярну вагу 34 000 і містить два геми. Втім, питання про локалізацію гемів на поверхні глобіну не вважається остаточно вирішеним, оскільки є інша точка зору, відповідно до якої дископодібні геми розташовані не на поверхні, а впроваджені в складки або щілини поверхні глобіну. Виходячи із цього положення, була зробле-



Мал.4 Схема зв'язку  
гема та глобіну

на спроба пояснення S-подібної форми кривої дисоціації оксигемоглобіну та характеру взаємодії між гемами – « гем-гем-взаємодія».

Ця теорія внутрішньоскладчастого положення чотирьох гемів між шарами глобіну припускає певне лімітування доступу кисню до гемів. Правда, при наближенні молекули кисню до першого гема і утворенні оксигенованого комплексу, шар білка, де локалізований гем, розсовується і протеїнова структура, частково змінюється, ніж полегшується доступ кисню до другого гема. Далі ступінь труднощів проникнення кисню прогресивно зменшується, і це відбивається в S-подібній кривій зворотної реакції між гемоглобіном і киснем.

Для підтвердження правильності цієї точки зору були досліджені реакції вільного гема та гемоглобіну з різними алкільними ізоціанідами, такими, як етил-, ізопропіл- і третинний бутилізоціанід. Було знайдено, що в той час, як природа й розміри цих ізоціанідів не впливають на їхню спорідненість до вільного гема, вони мають помітний вплив на їх спорідненість до гемоглобіну. Виявилося, що спорідненість гемоглобіну до ізопропіл- і третинного бутилізоціаніду відповідно в 3 і 200 разів нижче, ніж його спорідненість до етілізоціаніду. Падіння спорідненості пояснюється збільшенням молекулярних розмірів.

## **МНОЖИННІСТЬ ГЕМОГЛОБІНІВ**

Дані порівняльних фізіолого-біохімічних досліджень гемоглобінів крові різних тварин виявили не тільки міжвидові, але й внутрішньовидові розходження гемоглобінів. В організмі однієї тварини існує кілька гемоглобінів з різною кисневою ємністю.

Великий фактичний матеріал, накопичений дотепер, безперечно свідчить про гетерогенну природу гемоглобінів крові багатьох видів тварин.

Установлення гетерогенної природи гемоглобінів стало можливим завдяки застосуванню цілого комплексу найточніших методів дослідження, що характеризують їх фізико-хімічні властивості, - такі, як електрофорез, хроматог-



рафія, лужна денатурація, кристалізація, спектрофотометрія, спорідненість до кисню та ін.

За допомогою цих методів дослідження була показана наявність декількох різновидів гемоглобіну в крові людини та тварин. Так, наприклад, найкраще вивчений гемоглобін крові людини має іншу природу і властивості в період внутрішньоутробного розвитку (*фетальний гемоглобін*) і в постнатальний період (*«дорослий» гемоглобін*). Зокрема, доведено, що нормальний гемоглобін дорослої людини (Adult Hb, або гемоглобін А в англійській літературі) складається із двох а- і двох б-поліпептидних ланцюгів. При деяких умовах молекула гемоглобіну може дисоціювати на дві частини, кожна з яких містить два а- або два б-ланцюги.

На підставі визначення кількості міченого  $C^{14}$ , що зв'язується цими ланцюгами, висловлена думка, відповідно до якої б-ланцюг утворює спеціальні зв'язки з гемом, обумовлюючи можливість оксигенації гемоглобіну.

*Фетальний гемоглобін* людини складається із двох а-поліпептидних ланцюгів, ідентичних з  $\alpha$ -ланцюгами гемоглобіну А та із двох так званих  $\beta$ -ланцюгів, що злегка відрізняються від  $\beta$ -ланцюгів гемоглобіну А. В еритроцитах нормальної людини, крім гемоглобіну А, є кілька різновидів, позначуваних як гемоглобін  $A_2$  (близько 2—3%), гемоглобін  $A_1$  і  $A_3$  (близько 5%). Аналіз поліпептидних ланцюгів гемоглобіну  $A_2$  показав, що поряд з а-ланцюгами, ідентичними а-ланцюгам гемоглобіну А, до його складу входять ланцюги, які хоча й показують деяку подібність із  $\beta$ -ланцюгами, але в певних ділянках мають явні розходження, внаслідок чого їх позначають як S-ланцюги. На цій підставі для позначення гемоглобіну  $A_2$  запропонований символ  $Hb_2\alpha_2S_2$ , для гемоглобіну дорослої людини –  $HbA_2\alpha_2\beta_2$  і для фетального гемоглобіну –  $HbF_1\alpha_2\beta_2$ .

Крім цих різновидів гемоглобінів крові, що зустрічаються в нормі, виявлений ряд гемоглобінів крові дорослої людини й плода, що характеризуються певними відхиленнями як у властивостях, так і в будові. Зокрема, при серповидній анемії, вродженому, спадковому захворюванні,

еритроцити набувають форму серпів або півмісяця внаслідок зниженої розчинності гемоглобіну, завдяки чому у середині еритроцита гемоглобін кристалізується. Агрегація кристалів гемоглобіну й обумовлює зміну форми еритроцита. Гемоглобін крові цих хворих на відміну від гемоглобіну здорових людей має іншу рухливість в електричному полі, іншу ізоелектричну точку.

Як раніше відзначалось, дослідження триптичних гідролізатів гемоглобіну нормального й *серповидного* (гемоглобін S) показало, що при цьому утворюється близько 30 фрагментів, які є уламками пептидних ланцюгів. Порівняння цих пептидів за допомогою хроматографічного та катафоретичного методів показало, що в серповидному гемоглобіні тільки один з них (пептид 4) відрізняється від норми.

Характеристика білків за особливостями пептидів з допомогою електрофореграм і хроматограм, позначувана як «дактилограмний» метод, подібно зіставленню відбитків пальців («fingerprints») широко використовується при характеристиці інших різновидів гемоглобіну. Таким шляхом було встановлено, що гемоглобін S і гемоглобін C відрізняються від гемоглобіну A тим, що в них залишок глютамінової кислоти поблизу кінцевого азоту  $\beta$ -ланцюга замінений валіном та лізином відповідно, у випадку гемоглобіну G - гліцином, гемоглобіну E - лізином. Подібні розходження виявлені при дослідженні гемоглобіну D, гемоглобіну I. У всіх цих випадках розходження обумовлюються заміною всього лише однієї з кількох сотень амінокислот.

Описані й інші різновиди гемоглобіну людини: гемоглобін H, гемоглобін J, гемоглобін M, гемоглобін K, гемоглобін L, гемоглобіни N, O, P, Q.

Одержані в результаті дисоціації половини молекул з аномалією  $\alpha$ - і  $\beta$ -ланцюгів нормального й патологічного гемоглобінів можна рекомбінувати у нормальні та подвійно патологічні молекули, а також приготувати гібриди гемоглобіну A і гемоглобіну кролика. Деякі патологічні гемоглобіни характеризуються наявністю агрегації аномаль-

них напівмолекул. Зокрема, патологічний гемоглобін Н складається із чотирьох  $\beta$ -ланцюгів, патологічний фетальний гемоглобін «Barts» складається із чотирьох  $\gamma$ -ланцюгів.

Аналіз характеру успадкування варіантів гемоглобіну людини показує, що синтез  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -ланцюгів здійснюється незалежно один від одного.

Вважається, що гени, які контролюють синтез  $\alpha$ -ланцюгів, повинні бути активні протягом усього фетального й постнатального періоду, тоді як контролюючі синтез  $\gamma$ -ланцюга постійно заміщаються його двійником по синтезу  $\beta$ -ланцюгів в останній період фетального і раннього постнатального життя.

У деяких патологічних випадках (лептоцитоз і ретикулоцитоз) виявлені фракції гемоглобіну А, С і G в організмі однієї людини.

Частота зустрічі різних різновидів гемоглобінів варіює в різних народів. Вважається, що в Центральній Африці захворювання на серповидну анемію досягає 20%, а в Західній Африці частота гемоглобіну С досягає 14%.

Електрофоретично показана гетерогенність м'язового гемоглобіну людини. Виявлено три різних компоненти м'язового гемоглобіну.

## **ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОГО КОНТРОЛЮ**

1. Коли була встановлена наявність заліза в крові?
2. Ким була виявлена здатність крові утворювати кристали?
3. У чому полягає кількісний метод І.Гвоздьова?
4. Який хімічний склад має гематин?
5. Характеристика кристалів геміну за М.Шалфеевим.
6. Характеристика елементарного аналізу геміну.

7. Характеристика гемохромогену.
8. Номенклатура гемохромогенів.
9. Характеристика гематопорфірину.
10. Філопорфірин, його склад.
11. Мезопорфірин, його склад.
12. Характеристика етіопорфіринів.
13. Пірол, його гомологи в геміні.
14. Що собою являє ядро порфірину.
15. Властивості глобіну.
16. Які розміри молекули гемоглобіну?
17. Характеристика просторового розташування поліпептидних ланцюгів у молекулі гемоглобіну.
18. Характеристика рентгеноструктурного аналізу молекули гемоглобіну.
19. У чому суть теорії внутрішньоскладчастої будови гемоглобіну?
20. Які види гемоглобіну виділяють у людини?
21. Структура фетального гемоглобіну, його вміст.

## РОЗДІЛ 2. ФІЗІОЛОГІЯ ГЕМОГЛОБІНУ

Кров - основна транспортна система організму. Вона являє собою тканину, що складається з рідкої частини - плазми й зважених у ній клітин. Залежно від характеру переносних речовин і їх природи кров виконує такі функції в організмі:

- 1) живильна функція - приносить клітинам поживні речовини із травного тракту;
- 2) газотранспортна - у клітини  $O_2$ , із клітин  $CO_2$ ;
- 3) екскреторна - доставляє продукти розпаду речовин до нирок та інших органів виділення;
- 4) регуляторна - здійснює гуморальну регуляцію діяльності органів і систем організму, доставляючи до них гормони й інші фізіологічно активні речовини;
- 5) захисна - забезпечує імунітет; охороняє організм від крововтрати - здатність до згортання;
- 6) гомеостатична - бере участь у підтримці сталості внутрішнього середовища організму (водний баланс, рівень глюкози);
- 7) функція креаторних зв'язків - за допомогою плазми й формених елементів переносяться макромолекули, що здійснюють в організмі інформаційні зв'язки; завдяки чому в організмі регулюються внутрішньоклітинні процеси синтезу білка, клітинні диференціювання;
- 8) теплорегуляційна - у результаті безперервного руху й великої теплоємності кров сприяє перерозподілу тепла в організмі.

У людини кількість крові становить приблизно 6-8% маси тіла ( 4-6 л). Наявна в організмі кров у звичайних умовах не вся циркулює по судинах. Частина її перебуває в депо: у печінці - 20%, селезінці - 16%, у шкірі - 10%. Щільність крові - 1, 060-1,064 г/мл. Осмотичний тиск крові становить 7,3 атм (5600 мм рт.ст. або 745 кПа, що відповідає температурі замерзання - 0,54С).

Плазма крові - складна біологічна рідина. Її кількість - 40-47 мл на 1 кг маси тіла. Плазма крові складається з 93-95% води й 5-7% щільних речовин. Щільність плазми 1024-1030, в'язкість 1,32 і рН 7,36. Головні катіони й аніони: натрій, калій, кальцій, магній, хлор. У плазмі мітяться 6-8% білків. Зараз відомо більше 100 білків плазми. Білки надають крові в'язкості і сприяють стабілізації формених елементів крові. Основні білкові фракції плазми – альбуміни й глобуліни.

До формених елементів крові належать еритроцити, лейкоцити й кров'яні пластинки.

Еритроцит людини являє собою клітину, позбавлену ядра, має округлу форму із вдавленнями усередину клітини по середині еритроцита по обидва боки. Еритроцит проходить по кров'яному руслу біля двох кілометрів за день.

Кількість еритроцитів: у чоловіків –  $4,5-5,5 \times 10^{12}$ /л або млн. в  $1 \text{ мм}^3$ ; у жінок –  $3,7-4,7 \times 10^{12}$ /л або млн. в  $1 \text{ мм}^3$ . Еритроцити утворюються в червоному кістковому мозку. Тривалість життя – 130 днів.

В еритроцитах знаходиться барвник гемоглобін. Гемоглобін виконує роль переносника кисню й вуглекислоти. Кількість гемоглобіну: у чоловіків – 130-150 г/л (13-15г%); у жінок – 120-140 г/л (12-14г%).

Гемоглобін - це забарвлений дихальний пігмент крові, що транспортує кисень від легенів до тканин, а назад – вуглекислий газ.

Гемоглобін віддає тканинам за добу близько 600л кисню. У тканинах за добу утворюється близько 500 л вуглекислого газу.

Молекула гемоглобіну складається із чотирьох гемів і чотирьох поліпептидних ланцюгів (глобіну). Спіральні відрізки ланцюгів становлять 75% маси всієї молекули, між ними розташовані не спіральні ділянки. Між складками поліпептидних ланцюгів утримується гідратаційна вода (на 1 г сухого гемоглобіну - до 0,4 г води). Поліпептидні ланцюги, стортаючись, утворюють «ніші» або «кишені», у яких розташовуються геми. Один гем і один поліпептид-

ний ланцюг являють собою субодиницю, яких у молекулі гемоглобіну чотири. На частку простатичної групи доводиться приблизно 4% маси гемоглобіну, близько 96% становить глобін. Гем складається із протопорфірину IX з включеним у нього атомом двовалентного заліза.

Один атом заліза здатний приєднати одну молекулу кисню, 1 грам гемоглобіну може перенести 1,34 мол кисню. Стійкість молекули гемоглобіну забезпечується властивостями амінокислот, взаємодією гема із глобіном, хімічними зв'язками між ланцюгами.

У фізіологічних умовах у здоровому організмі в процесі його життєдіяльності з'являються продукти перетворення гемоглобіну, такі як карбоксигемоглобін, метгемоглобін, вердоглобін, що утворюються при впливі ряду речовин і не є наслідком спадково обумовленої зміни структури гемоглобіну.

*Карбоксигемоглобін* утворюється в результаті катаболізму гемоглобіну. У нормі в крові людей, які не палять, міститься 0,25–2,1% загального гемоглобіну, в крові людей, які палять – до 6,6%.

*Метгемоглобін* (MetHb) – похідне гемоглобіну, що містить тривалентне залізо. Він не може зв'язувати кисень, у силу чого речовини, що сприяють його утворенню, пригнічують газообмін.

Утворення метгемоглобіну є звичайним фізіологічним процесом. У нормі в зрілих еритроцитах міститься до 2% метгемоглобіну, що утворюється за рахунок аутоокислення. Однак подальшого накопичення MetHb не відбувається, оскільки він здатний знову відновлюватися у Hb при участі двох діафоразних систем - НАД x H та НАДФ x H у комплексі з метгемоглобінредуктазою. У свою чергу, достатнє утворення відновлених форм нікотинових коферментів відбувається на етапах метаболізму глюкози по гліколітичному ланцюгу і пентозофосфатному шляху.

У міру старіння еритроцита в ньому знижується активність деяких ферментів ( 80-денна клітка містить уже близько 8% MetHb).

Таким чином, для нормального відновлення MetHb істотне значення мають цілісність структури еритроциту, налагодженість його обмінних процесів і наявність у плазмі речовин (наприклад, глюкози), необхідних для метаболізму червоних кров'яних клітин і тим самим відновлення метгемоглобіну.

*Вердоглобін* являє собою зелений пігмент, що утворюється в результаті деяких реакцій окислювання.

На відміну від гема порфіринове кільце в простетичній групі вердоглобіну розкрито в результаті окислювання  $\alpha$ -метинового містка.

Вердоглобіни - незворотні продукти окислювання хромопротейдів, вони не беруть участі в транспорті кисню. У фізіологічних умовах вердоглобіни утворюються при розпаді гемоглобіну й синтезі жовчних пігментів у незначних кількостях (до 0,3-0,4% загального гемоглобіну).

Гемоглобін, що приєднав кисень, називається *оксигемоглобіном*, а оксигемоглобін, що віддав кисень, - відновленим гемоглобіном.

Гемоглобін може приєднувати й інші гази, наприклад чадний газ. Така сполука називається *карбоксигемоглобіном*.

При дії сильних окислювачів гемоглобін окисляється й перетворюється в метгемоглобін. (Окислювачі: перманганат калію, бертолетова сіль).

## **РОЛЬ ГЕМОГЛОБІНУ В ТРАНСПОРТІ ВУГЛЕКИСЛОТИ**

Вивчення процесів транспорту кисню кров'ю виявило важливу роль вуглекислоти у зв'язуванні кисню гемоглобіном, про що свідчать зміни в положенні кривих дисоціації оксигемоглобіну: чим більший парціальний тиск вуглекислоти, тим сильніше зсув кривої дисоціації оксигемоглобіну вправо. Пізніше було показано, що ефект впливу вуглекислоти не ідентичний ефекту, що викликається зміною концентрації водневих іонів, як вважалося колись, і що можна говорити спеціально про вуглекислотний ефект. Разом з тим, при вивченні механізмів транспорту вуглеки-



слоти встановлено, що той чи інший ступінь оксигенації гемоглобіну у свою чергу впливає на транспорт вуглекислоти. Це можна бачити на кривій дисоціації вуглекислоти: якщо кров вільна від кисню, то при даній напрузі вуглекислоти вона зв'язує її помітно більше, ніж кров, повністю насичена киснем. Оксигенація гемоглобіну в органах дихання сприяє витісненню вуглекислоти.

Криві дисоціації вуглекислоти мало відрізняються від кривих дисоціації, характерних для буферних речовин.

За вмістом кисню артеріальна кров різко відрізняється від венозної, а щодо вуглекислоти ця різниця незначна. Здатність крові зв'язувати кисень визначається вмістом гемоглобіну, і артеріальна кров майже насичена киснем. Здатність же крові зв'язувати вуглекислоту майже необмежена, тому що при підвищенні напруги вуглекислоти підвищується й зв'язування її кров'ю. Ця особливість обумовлена високою розчинністю вільної вуглекислоти в порівнянні з киснем, а також наявністю в крові значної кількості основ, які зв'язують вуглекислоту. Тому криві дисоціації оксигемоглобіну при високих напругах кисню розташовуються майже горизонтально, тоді як криві дисоціації вуглекислоти дуже повільно піднімаються вверх. Отже, форма кривих дисоціації оксигемоглобіну й вуглекислоти дає можливість виявити роль гемоглобіну в транспорті газів.

Механізми транспорту вуглекислоти більш різноманітні на відміну від механізмів транспорту кисню. Найважливіша роль належить дихальним пігментам, зокрема гемоглобіну. Відомо, що вуглекислота, яка утворюється в тканинах, присутня у крові не тільки у формі розчиненої вуглекислоти (незважаючи на її значну розчинність у воді й водяних розчинах), але більша її частина перебуває в хімічно зв'язаному вигляді: гідрату —  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , бікарбонату —  $\text{NaHCO}_3$ , зв'язаної гемоглобіном —  $\text{HbCO}_2$ .

Існує ще одна форма зв'язку вуглекислоти, так звана у зв'язана вуглекислота, що має, однак, невелику питому вагу: при підкисненні у вакуумі завжди виходить більше ву-

глекислоти, ніж сума бікарбонатної і карбамінової вуглекислоти.

У загальному балансі транспорту вуглекислоти пряма роль гемоглобіну як переносника вуглекислоти відносно невелика. Вуглекислота, виділювана кров'ю при проходженні по капілярах органів дихання, складається з таких джерел: близько 10% утворюється з фізично розчиненої вуглекислоти, майже 20% - з карбамінових сполук гемоглобіну й близько 70% - з бікарбонатних іонів.

Таким чином, на частку гемоглобіну пипадає близько 20% всієї вуглекислоти, що транспортується. Тільки на відміну від кисню, що зв'язується залізом простетичної групи, вуглекислота зв'язується білковою частиною молекули гемоглобіну, її вільними амінними групами, у вигляді карбамінових сполук:



Приєднання й відщиплення  $\text{CO}_2$  відбувається надзвичайно швидко, без участі якого-небудь ферменту й проміжного утворення  $\text{H}_2\text{CO}_3$ .

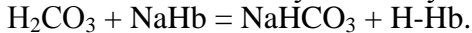
Крім гемоглобіну, інші білки плазми крові, як буферні речовини також беруть участь у транспорті вуглекислоти, однак роль гемоглобіну важлива насамперед тому, що його кількість у крові переважає.

Однак, як зазначалося вище, гемоглобін бере участь у транспорті вуглекислоти не тільки прямим, але й непрямим шляхом. Відомо, що у хребетних тварин міститься приблизно  $50 \text{ см}^3$  вуглекислоти в  $100 \text{ см}^3$  крові. З них на частку фізично розчиненої вуглекислоти доводиться близько 3%. Частина цієї вуглекислоти, реагуючи з водою, утворює нестійку, слабо дисоційовану вугільну кислоту:



На відміну від розчинів вуглекислоти в чистій воді, де цей процес утворення  $\text{H}_2\text{CO}_3$  і її дисоціації на  $\text{H}^+$  і  $\text{HCO}_3^-$  має незначну величину, у крові завдяки наявності буферних речовин (головним чином білків плазми, особливо гемоглобіну) і зв'язуванню  $\text{H}^+$  майже 95% поглиненої вуглекислоти існує у вигляді  $\text{HCO}_3^-$ .

Утворюючись у клітинах тіла як кінцевий продукт окисних процесів, вуглекислота вступає у взаємодію із солями ще більш слабких, ніж вона сама, кислот, а саме, з натрієвими солями білків плазми, головним чином – із солями дихальних пігментів (у хребетних – з калієвими солями гемоглобіну в еритроцитах). Як більш сильна кислота вона приєднує до себе лужні іони, а іон білка утворює із іоном водню малодисоціюючу кислоту:



Оскільки в капілярах тіла оксигемоглобін, віддаючи кисень, перетворюється в гемоглобін, стаючи більш слабкою кислотою в порівнянні з оксигемоглобіном, і оскільки парціальний тиск вуглекислоти тут великий, концентрація  $\text{HCO}_3$  зростає, і реакція йде зліва направо, тобто у бік зв'язування вуглекислоти.

У легенях же, де гемоглобін, приєднуючи кисень, перетворюється в оксигемоглобін, тобто в кислоту приблизно у 70 разів більш сильну, ніж гемоглобін, відбувається зв'язування частини тих лужних металів, які перед тим були зв'язані з вуглекислотою. Вуглекислота, яка таким шляхом витісняється, підвищує парціальний тиск фізично розчиненої в крові вуглекислоти, що призводить до виділення її із крові в органах дихання. Саме цим пояснюється й більш низьке положення кривої дисоціації вуглекислоти в артеріальній крові в порівнянні з венозною. Таким чином, гемоглобін відіграє важливу роль у транспорті вуглекислоти, як одна з найважливіших буферних речовин, які зв'язують значні кількості вуглекислоти, утвореної в результаті окисних процесів, та охороняють порожнинні рідини від закислення.

Гемоглобін як головна буферна сіль, хоча й сконцентрований в еритроцитах, побічно впливає також на здатність плазми транспортувати вуглекислоту. Відомо, що концентрація іонів хлору в плазмі приблизно вдвічі більша, ніж в еритроцитах, незважаючи на те, що іони хлору легко проникають через клітинну оболонку.

Крім того, при проходженні крові через легеневі капіляри та видаленні при цьому із крові вуглекислоти части-

на іонів хлору переміщається з еритроцитів у плазму, тобто з місць із меншою концентрацією в місця з більшою концентрацією, всупереч звичайним законам дифузії.

Це переміщення іонів хлору має безпосереднє відношення до транспорту вуглекислоти. Оскільки концентрація буферних солей (К-гемоглобін та ін.) вища в еритроцитах, ніж у плазмі, то при проходженні крові через капіляри тіла вуглекислота проникає в еритроцити й реагує тут із солями гемоглобіну, утворюючи бікарбонати К та Na у більшій кількості, ніж у плазмі.

Внаслідок цього підвищення концентрації  $\text{HCO}_3^-$  в еритроцитах у порівнянні із плазмою, тобто порушення іонної рівноваги, частина  $\text{HCO}_3^-$  переходить із еритроцитів у плазму. Але одnobічна дифузія аніонів бікарбонату порушила б умови електричної нейтральності, оскільки позитивно заряджені іони К і Na не здатні дифундувати з еритроцитів у плазму. Порушення ж електричної нейтральності призвело б до появи на межі еритроцитів і плазми сильного електричного поля, що перешкоджало б подальшій дифузії  $\text{HCO}_3^-$ .

Це можливе порушення компенсується надходженням  $\text{Cl}^-$  із плазми в еритроцити, завдяки чому електронейтральність відновлюється й створюється можливість для подальшої дифузії іонів карбонату в плазму.

У результаті такого обміну  $\text{HCO}_3^-$  і  $\text{Cl}^-$  значна частина іонів бікарбонату, що утворилися усередині еритроцитів, дифундує в плазму, тобто тим самим підвищується роль плазми в транспорті вуглекислоти.

Важливо відзначити, що транспорт вуглекислоти, який здійснюється за допомогою гемоглобіну як дихального пігменту, філогенетично вступив у дію пізніше інших механізмів видалення вуглекислоти з організму.

Морська вода має здатність зв'язувати вуглекислоту завдяки наявності в ній карбонатів і бікарбонатів, тобто тієї самої системи, що грає таку значну роль у транспорті вуглекислоти у вищих тварин.

## **ЕМБРІОНАЛЬНЕ КРОВОТВОРЕННЯ**

Кровотворна тканина розвивається вже на ранніх стадіях ембріогенезу людини. Перші вогнища кровотворення в ембріона знаходяться в острівцях жовточного мішка. Потім відбувається послідовна зміна вогнищ кровотворення - печінка, селезінка, кістковий мозок.

Перший період гемоцитопоезу починається на 2-3 тижні розвитку ембріона. Із центральних клітин кров'яних острівців позаембріональної мезенхіми утворюються примітивні клітини крові, а з розташованих по периферії утворюються судини. Кров'яні клітини в основному представлені примітивними еритробласти. Ці клітини округлої форми, більших розмірів, та містять ядро. На перших тижнях ембріогенезу еритроїдні клітини, які надходять в кров'яне русло, містять ядро, але вже до кінця 6 тижня внутрішньоутробного розвитку в кровоносному руслі є первинні еритроцити, що втратили ядро. Головною особливістю кровотворення є те, що вже на цьому етапі в жовточному мішку ембріона містяться стовбурні поліпотентні клітини, що дають початок всім паросткам кровотворення.

На 4-5 тижні жовточний мішок атрофується, і кровотворна функція його поступово припиняється. На цьому закінчується перший етап і починається власне ембріональне кровотворення. На 3-4 тижні ембріогенезу відбувається закладання печінки, що на 5-6 тижні стає джерелом кровотворення – печінковий період еритропоезу. Першими елементами, які продукує печінка, є первинні еритробласти (мегалобласти), які перетворюються в первинні еритроцити (мегалоцити). На 2-3 місяці внутрішньоутробного розвитку вже починають утворюватися вторинні еритробласти, поступово заміщаючи примітивні елементи. У період печінкового кровотворення основну масу становлять еритроїдні клітини, але вже на 8-10 тижні внутрішньоутробного розвитку визначаються попередники гранулоцитарного ряду.

Кровотворення в печінці досягає максимуму до 18-20 тижня внутрішньоутробного розвитку й надалі починає

знижуватися. Як правило, до кінця внутрішньоутробного періоду кровотворення в печінці припиняється.

Наприкінці 3 місяця життя ембріона майже одночасно закладаються селезінка й кістковий мозок. З 12 тижня внутрішньоутробного розвитку селезінка включається в процес кровотворення. Роль селезінки як універсального органа кровотворення в пренатальний період обмежена. Протягом декількох тижнів у мезенхімі селезінки є колонії стовбурних поліпотентних клітин, що забезпечують еритропоез, гранулоцитопоез, утворення мегакаріоцитів. Потім у селезінці відбувається розвиток лімфатичних вогнищ і з 20-го тижня ембріогенезу починається інтенсивний лімфопоез. Селезінка втрачає функції універсального органа кровотворення й починає виробляти В-лімфоцити, що несуть імуноглобуліни. Однак селезінка, як і лімфатичні вузли, є вторинним лімфоїдним утворенням, основну роль вона грає в постнатальний період. У період ембріогенезу, а також у перші роки постнатального розвитку людини важливе значення в лімфопоезі належить первинним лімфоїдним органам, якими в хребетних є тимус, а в птахів – фабрицієва сумка. Тимус закладається на 5-6 тижні внутрішньоутробного розвитку, а з 9-10 тижня в його стромі вже виявляються перші лімфоцити. В ембріогенезі тимус відіграє активну роль як орган, що визначає диференціювання Т-лімфоцитів. Роль тимуса в лімфопоезі зберігається в ранній постнатальний період, вгасає тільки після формування периферичної лімфатичної системи й переміщення туди лімфопоезу.

Розвиток периферійної лімфатичної тканини починається на початку 4 місяця внутрішньоутробного життя. Перші зачатки лімфатичних вузлів з'являються в ділянці шийних лімфатичних мішків. Повного розвитку лімфатична система досягає вже після народження дитини.

На 13-14 тижні внутрішньоутробного розвитку в кістковому мозку з'являються перші вогнища кровотворення. Їхня локалізація поступово змінюється. У ранній ембріональний період вони зосереджені в трубочастих кістках -

діафізи стегнової, плечової кісток. У міру розвитку кісткового скелету вони переміщуються в пласкі губчасті кістки.

У дітей перших років життя в діафізах трубчастих кісток зберігаються вогнища кровотворення, тому що 50% всієї кісткомозкової субстанції становить червоний кістковий мозок. Починаючи з 6 років, відбувається заміщення червоного кісткового мозку жировим кістковим мозком, і центри гемоцитопоезу залишаються в пласких губчастих кістках і епіфізах довгих трубчастих кісток. Уже на ранніх етапах внутрішньоутробного розвитку кістковий мозок містить поліпотентні стовбурні клітини, хоча в основному має мієлоїдну спрямованість кровотворення - еритро-, грануло- і мегакаріоцитопоез. Проте він не аналогічний фабрицієвій сумці птахів. До моменту народження дитини екстрамедулярні вогнища мієлоцитопоезу майже повністю ліквідуються і центром кровотворення стає кістковий мозок, спочатку трубчастих, а пізніше пласких губчастих кісток. Селезінка і лімфатичні вузли зберігають своє значення в процесах лімфоцитопоезу.

Завдяки зусиллям цитологів і цитохіміків питання розвитку й дозрівання еритроцитів одержали певне вирішення, у зв'язку із чим зараз є дані не тільки про час появи гемоглобіну, але й про темпи його збільшення в процесі дозрівання. Однак далеко ще не відомі найтонші біохімічні процеси, у результаті яких відбувається синтез молекули гемоглобіну в зріючому еритробласти. Тривалий час не було ніяких даних про хімічні попередники гема, які є вихідними компонентами, що визначають його синтез. Зовсім недавно встановлено, що після годівлі людини або тварин амінокислотою гліцином, міченою важким ізотопом  $N^{15}$ , у циркулюючій крові швидко збільшується кількість еритроцитів, у молекулі гемоглобіну яких утримується  $N^{15}$  у вигляді складової частини гема, і залишається більш-менш постійним близько 80 днів, після чого швидко знижується. Серед інших амінокислот, мічених азотом  $N^{15}$ , тільки серін показав такий же високий ефект засвоєння, як і гліцин.

Ці дані свідчать про те, що гліцин спеціально утилізується при синтезі гема й що молекули гемоглобіну, які містять гем з ізотопом азоту ( $N^{15}$ ) у складі еритроцитів, циркулюють у крові близько 120 днів. Тим самим стало можливим установити й тривалість життя еритроцитів.

Раніше наводилися дані про гемоглобін як хромопротеїд, що складається з безбарвного білка глобіну, на поверхні якого розташовані чотири простетичні групи гема. Геми надають червоного кольору молекулі гемоглобіну. Наявні дані свідчать про те, що синтез білкової частини гемоглобіну й синтез простетичної групи можуть протікати у різний час.

Раніше відзначалося, що проеритробласт як вихідна клітина еритроцитарного ряду (діаметр 19 мк) містить у хроматині ядра дезоксирибонуклеїнову кислоту, а цитоплазма - рибонуклеїнову кислоту, концентрація якої досягає 5,0% і вище. Цей високий вміст РНК іде паралельно з базофільним забарвленням, максимальна інтенсивність якого спостерігається в проеритробласті. На цій стадії розвитку клітини інтенсивно розмножуються й, отже, у цей час відбувається інтенсивний синтез білка та нуклеїнової кислоти як у ядрі, так і в цитоплазмі.

На стадії раннього базофільного еритробласту вміст РНК у цитоплазмі знижується до 2,0%, ядро втрачає своє ядерце, а на стадії поліхроматофільного еритробласту концентрація РНК знижується ще більше, у зв'язку із ніж знижується й спорідненість цитоплазми до основних фарб. У той же час стає помітним забарвлення кислими барвниками, що вказує на збільшення концентрації основного білка глобіну. Таким чином, підвищення інтенсивності забарвлення кислими барвниками відображує темпи збільшення вмісту гемоглобіну в клітині.

І якщо високий вміст білків клітини на стадії проеритробласту визначається головним чином наявністю глобіну, то гем, необхідний для утворення гемоглобіну, приєднується тільки на стадії пізнього еритробласту або поліхроматофільного еритробласту.



Звідси випливає, що коли синтез глобіну починається з перших стадій і, поступово убуваючи, триває в процесі дозрівання еритроциту, то синтез гему найбільш інтенсивний в останній стадії дозрівання еритроциту й протікає протягом невеликого проміжку часу дозрівання. Цікаво, що введення незначних доз кобальту в кістковий мозок значно підвищує синтез глобіну й гальмує синтез гема.

### **БІОСИНТЕЗ ГЕМОГЛОБІНУ**

Вважається, що у людини вагою 70 кг близько 900 г гемоглобіну, з яких щодня руйнується близько 8 г, або менш 1,0%, перетворюючись у жовчні пігменти. Ця кількість гемоглобіну, що руйнується, природно, відновлюється завдяки активності червоного кісткового мозку, який повинен викинути в кров'яне русло близько 10 млрд. еритроцитів за годину, або 3 млн. за секунду, що вимагає синтезу понад 300 мг білків і 12,5 мг гема.

Як ми вже відзначали, дані про біосинтез гемоглобіну вкрай обмежені. Більш детально вивчені основні етапи біосинтезу гема, однак послідовний хід реакцій, у результаті яких відбувається біосинтез залізопорфіринового комплексу і його сполуки із глобіном, виявлений поки недостатньо. В цьому відношенні, безсумнівно, важливу роль зіграло застосування методу мічених атомів, за допомогою якого вдалося з'ясувати ряд деталей, що характеризують конкретні шляхи біосинтезу простетичної групи – гема. Якщо до 1946 р. було мало відомо про хімічні попередники гема, то зараз завдяки застосуванню мічених атомів показано, що в процесі біосинтезу протопорфірину в організмі тварин вихідним компонентом є прості сполуки аліфатичного ряду, у першу чергу амінооцтова кислота - гліцин.

Так, наприклад, методом мічених атомів встановлено, що після введення в кров тваринних амінокислот, мічених за азотом і вуглицем, у простатичній групі гемоглобіну і у продуктах її розпаду знайдені ізотопи азоту й вуглецю.

Зокрема, у дослідах на пацюках *in vivo* після введення гліцину, міченого за азотом ( $N^{15}$ ), виявили в кожній піро-

льній одиниці порфіринового кільця як її компонент ізотоп азоту  $N^{15}$ . Такі ж результати були отримані з амінокислотою серином ( $\beta$ -гідроксил- $\alpha$ -амінопропіонова кислота), яку мітили за азотом ( $N^{15}$ ). Азот в ній був виявлений у протопорфірині IX у такій же кількості, як і у випадку з міченим гліцином. Інші сполуки, мічені за азотом ( $N^{15}$ ), як пролін, глютамінова кислота, лейцин і ацетат амонію, мало активні. Було також показано, що в процесі обміну речовин відбувається зворотне перетворення серину в гліцин. Однак при біосинтезі порфірину серин використовується лише після перетворення його в гліцин. Цей висновок підтверджується дослідями із кров'ю качки *in vitro*, у яких спостерігалось низьке включення серину  $N^{15}$ , якщо він був розведений більшою кількістю звичайного, неізотопного гліцину. Однак одночасне додавання звичайного серину з ізотопним гліцином не впливало на рівень утилізації останнього в порфірині. Таким чином, на цій стадії гліцин є відносно специфічним структурним попередником кістяка порфірину. Таке включення  $N^{15}$  із гліцину в структуру порфірину пояснюється тим, що при біосинтезі піролів гліцин, очевидно, конденсується з  $\beta$ -кетоеальдегідом, якщо виходити з аналогії з лабораторним синтезом піролу із формілацетону та гліцину. Гліцин, мічений за карбоксильним вуглецем (гліцин-1- $C^{14}$ ), утворює при введенні в організм собаки неактивний протопорфірин IX, хоча  $C^{14}$  і включений у глобін. Було також показано, що гліцин, мічений за  $\alpha$ -вуглецем або метильним вуглецем (гліцин-2- $C^{14}$ ), бере активну участь у біосинтезі порфірину.

Отже, карбоксильний вуглець гліцину не утилізується при біосинтезі порфірину, і в цьому процесі бере участь тільки частина молекули гліцину  $NH_2 - CH_2$ .

Вивчення продуктів розпаду геміну показало, що після введення гліцину-2- $C^{14}$  радіоактивність розподіляється рівномірно в пірольних кільцях — один мічений атом вуглецю в кожному піролі, у положеннях 2', 4', 6', 7' і 4 метинових вуглецю.

Крім того, виявлено, що при розпаді міченого ізотопами порфірину виникають похідні малеїнової кислоти (з I і II кілець піролу) і гематинової кислоти (з III і IV кілець) та 4 молекули вуглекислоти (за рахунок метинових містків тетрапірольного циклу), які містять мічені атоми вуглецю.

Встановлено також, що метильна група ацетату є джерелом утворення метинових містків. З 34 атомів вуглецю, що входять до складу протопорфірину IX, на частку порфінового скелету припадає 20 атомів, а на частку бічних ланцюгів — 14. У дослідах з дейтеріоацетатом ( $\text{CD}_3\text{COO}'$ ) показано, що третя частина воднів бічних ланцюгів походить із метильної групи оцтової кислоти.

Було відзначено, що оцтова кислота, мічена за метильним вуглецем (ацетат-2- $\text{C}^{14}$ ), включається до складу порфірину в 6 разів інтенсивніше від оцтової кислоти, міченої за карбоксильним вуглецем (ацетат-1- $\text{C}^{14}$ ).

Досліди з вивчення продуктів розпаду порфірину дозволяють зробити висновок, що метильна група ацетату є прабатьком 4 метильних груп бічних ланцюгів і, імовірно,  $\beta$ -вуглецю (вуглець 1, 3, 5 і 8) пірольних кілець. Карбоксильна група ацетату може служити джерелом кислотних груп порфірину. Таким чином, 2 вуглеці ацетату є потенційними попередниками принаймні 12 вуглеців протопорфірину IX.

Отже, 20 вуглеців з 34 походять від гліцину і ацетату. Тому вважається, що синтез порфірину може бути забезпечений головним чином за рахунок цих двох джерел.

Крім цих вихідних речовин, у біосинтезі протопорфірину використовуються й інші, як, наприклад, глюкоза, піровиноградна кислота, а також янтарна, глютамінова й  $\alpha$ -кетоглутарова кислоти, які утворюються з оцтової кислоти.

На підставі багатьох досліджень зараз вважається, що попередником порфірину є монопірол порфобіліноген. Синтез порфобіліногену у тваринному організмі здійснюється за так званим янтарно-гліциновим циклом, тісно пов'язаним із циклом трикарбонових кислот. Відомо, що од-

ним із продуктів цього циклу є янтарна кислота, що активується коферментом А. Активована янтарана кислота, з'єднуючись із  $\alpha$ -вуглицем гліцину, перетворюється в  $\alpha$ -аміно- $\beta$ -кетoadипінову кислоту. Остання, після декарбок-силювання, у свою чергу, перетворюється в  $\delta$ -амінолевулінову кислоту, дві молекули якої утворюють порфобіліноген.

Порфобіліноген і є вихідним компонентом для синтезу порфірину. Вважається, що синтез порфірину здійснюється через ряд проміжних етапів. Спочатку два порфобіліногени утворюють дипірол, що перетворюється шляхом приєднання ще однієї молекули порфобіліногену в трипірилметан. Залежно від місця розриву зв'язку в трипірилметані утворюються два типи дипірилметанів - типу А та В. Конденсація дипірилметанів А та В призводить до утворення порфірину типу III, а двох дипірилметанів А - порфірину типу I. Відомо, що в організмі основною формою синтезу порфіринів є синтез порфірину типу III, тоді як порфірин типу I, синтезований у мінімальних кількостях, не використовується, являючи собою побічний продукт («помилку метаболізму»), що видалається у вигляді копропорфірину I.

Порфобіліноген представляє монопірол з оцтовим й пропіоновокислим бічними ланцюгами в  $\beta\beta'$ -положенні та  $\alpha$ -амінометильною групою, що має високу реактивність. Порфобіліноген був виявлений в 1931 р. у сечі хворого при гострій порфірії завдяки червоному забарвленню з реактивом Ерліха. Встановлено, що порфобіліноген є попередником як уропорфірину, так і копропорфірину й протопорфірину. При інкубації порфобіліногену з гемолізатом еритроцитів курчати він перетворюється в уропорфірин, копропорфірин і протопорфірин. Таким чином, якщо гліцин і сукцинат є вихідними речовинами, які організм використовує при біосинтезі порфіринів, то  $\delta$ -амінолевулінова кислота і порфобіліноген являють собою справжні інтермедіатори на шляху біосинтезу порфірину та гема.

Було також показано, що першим порфірином, що утворюється з порфобіліногену, є уропорфірин, який після декарбоксиляції й дегідрогенізації переходить у копропорфірин, потім у протопорфірин, який після включення заліза перетворюється в гем. Для нормального ходу біосинтезу порфірину і гема важливу роль відіграє ядро еритроцита (у дослідях із кров'ю птахів). Без'ядерні еритроцити людини, наприклад, не здатні синтезувати гем при додаванні гліцину. Однак, не маючи здатності утилізувати гліцин, еритроцит людини може утворювати велику кількість уропорфірину III і копропорфірину III. Але окисна декарбоксиляція копропорфірину (4 x) до утворення протопорфірину не відбувається, якщо не буде додана суспензія мітохондрій з печінки пацюка.

У всіх наведених схемах є ще неясності (особливо, коли мова йде про проміжні етапи біосинтезу порфірину й гема), однак всі вони безсумнівно свідчать про те, що тваринний організм має можливість синтезу порфіринів, які є вихідним матеріалом для синтезу гема - сполуки, що відіграє таку важливу роль у здійсненні процесу дихання в багатоклітинних організмів. Крім того, необхідно підкреслити ту обставину, що вихідними компонентами для біосинтезу пірольних кілець є відносно прості речовини - такі як гліцин, серин, ацетат, сукцинат, наявні в надлишку в організмі тварин.

З порфіринів, що зустрічаються в організмі, найбільш важливими є уропорфірин, копропорфірин, протопорфірин. Уропорфірин і копропорфірин знайдені в сечі й калі, а копропорфірин міститься також в еритроцитах. Можливо, він являє собою ступінь в утворенні порфірину, як було раніше зазначено.

Відомо, що в уропорфірині 8 атомів водню порфінового ядра замінені 4 ацетатами та 4 пропіоновокислими групами. Копропорфірини відрізняються від протопорфірину тим, що 2 пропіоновокислі групи заміщені 2 винильними групами, тобто вони мають 4 метильні та 4 пропіоновокислі групи.

Два ізомери кожного із цих порфіринів знайдені в природі (I і III тип). Порфірин III типу є ендogenous, тоді як порфірин I типу утворюється одночасно при синтезі порфірину III типу. На цій підставі говорять про «дуалізм» походження порфіринів. Вміст копропорфірину в нормі переважає в сечі і калі. Протягом доби у чоловіків екскреція копропорфірину в сечі коливається від 100 до 300, у жінок - від 75 до 275мкг. Інтенсифікація еритропоезу супроводжується збільшенням екскреції копропорфірину (до 400 мкг за день). Фекальний копропорфірин у нормі за день коливається від 400 до 1000 мкг.

Уропорфірин, виведений із сечею в нормі, становить у день 5-10 мкг. Фізіологічні кількості уро- і копропорфірину не викликають видимих змін у забарвленні сечі, однак при патологічних випадках, коли концентрація порфіринів різко збільшується, забарвлення може варіювати від вишневого до майже чорного кольору.

Еритроцити людини містять як вільний копропорфірин, так і вільний протопорфірин. Як відомо, протопорфірин як червоний пігмент еритроцитів, який здатний флюоресціювати, уперше був відзначений Ванденбергом в 1928г, а виділений і ідентифікований як протопорфірин IX в 1937 р. Гротепасом.

В 100 см<sup>3</sup> крові в нормі протопорфірину міститься в середньому 31 мкг, з коливаннями від 20 до 38 мкг. При анеміях, викликаних нестачею заліза або обумовлених інтоксикацією важких металів, його кількість різко зростає від 50 до 600 мкг; навпаки, при перніціозній анемії концентрація протопорфірину знижується (15-30 мкг).

Кількість вільного копропорфірину в еритроцитах у нормі не перевищує 2 мкг на 100 см<sup>3</sup> крові.

Вміст вільного протопорфірину залежить від швидкості його синтезу з попередників і швидкості його видалення в результаті з'єднання із залізом при синтезі гема. На різних стадіях розвитку та дозрівання еритроцитів темпи біосинтезу протопорфірину, очевидно, визначаються темпами синтезу гемоглобіну. Зокрема, еритробласт не містить протопорфірину, тоді як нормобласти мають найбільш ви-

соку концентрацію протопорфірину. Вона менша в ретикулоцитах і ще менша в зрілих еритроцитах.

Досліди із застосуванням міченого гліцину на кроликах показали, що ретикулоцити кролика, що з'явилися в результаті застосування фенілгідразину, можуть синтезувати гем *in vivo*. Синтез протопорфірину спостерігався також при інкубації крові *in vitro* протягом 24-48 годин, коли було відзначене збільшення вмісту протопорфірину.

Синтез гемоглобіну починається в еритроблестах на ранній стадії їхнього розвитку. У цей період в еритроблестах переважають порфірини. У міру дозрівання еритробласту в ньому збільшується кількість гемоглобіну, а вміст порфіринів зменшується. У біосинтезі гемоглобіну беруть участь залізо, вітамін В12, фолієва кислота й інші гемопоетичні фактори.

Гемоглобін як термін з'єднує кілька видів хромопротеїдів, що відрізняються білковим компонентом молекули, тобто амінокислотним складом поліпептидних ланцюгів.

У внутрішньоутробний період життя людини спочатку синтезуються  $\epsilon$ -поліпептидні ланцюги. Цьому періоду відповідає поява гемоглобіну Gover I, який складеться із чотирьох гемів і чотирьох  $\epsilon$ -ланцюгів. Синтез  $\alpha$ -поліпептидних ланцюгів, який почався і поступово наростає у внутрішньоутробний період, приводить до появи гемоглобіну Gover II, який складається із двох  $\alpha$ - і двох  $\epsilon$ -ланцюгів. Це відповідає жовточному періоду кровотворення. З початку періоду печінкового типу кровотворення синтезуються  $\gamma$ -ланцюги й згасає продукція  $\epsilon$ -ланцюгів. Із крові зникає гемоглобін Gover II і підсилюється синтез фетального гемоглобіну HbF (від лат. Foetus- плід), який включає два  $\alpha$ - і два  $\gamma$ - ланцюги.

До моменту народження дитини вміст фетального гемоглобіну становить у нормі до 70-90% загального. Цей гемоглобін в 100-150 разів стійкіший до денатуруючої дії розчину лугу (KOH або NaOH) у порівнянні з гемоглобіном здорових дорослих людей (HbA). Тому HbF називають також луго-стійким. Фетальний гемоглобін в 2,5-3 рази стій-

кіший до соляної кислоти. Він сприяє кращій оксигенації організму.

Всі властивості, що відрізняють фетальний гемоглобін від гемоглобіну дорослих, пояснюються розходженням в амінокислотному складі поліпептидних ланцюгів (по 39 амінокислотам).

Через 3-5 місяців після народження дитини, рідше до 1 року, фетальний гемоглобін майже повністю зникає із крові в результаті різкого зменшення синтезу  $\gamma$ -ланцюгів. У крові дітей після року, а також дорослих фетальний гемоглобін становить до 2-4% загального.

Ще у внутрішньоутробному періоді починається синтез  $\beta$ -поліпептидних ланцюгів, які в комбінації з  $\alpha$ -поліпептидними ланцюгами входять до складу гемоглобіну А (від лат. *adultus* - дорослий) із двома  $\alpha$ - і двома  $\beta$ -ланцюгами.

Дорослий гемоглобін складається із двох альфа-ланцюгів, що містять по 141 амінокислотному залишку, і двох бета-ланцюгів, що містять по 146 амінокислотних залишків. Таким чином, до складу глобінової частини гемоглобіну входить 574 амінокислоти. До моменту народження дитини дорослого гемоглобіну нараховується до 10-30%, і його кількість збільшується в міру зникнення фетального гемоглобіну. Після 1 року, дорослий гемоглобін є основним гемоглобіном, який становить 96-99%. Дорослий гемоглобін Hb А служить еталоном, з яким порівнюють всі інші гемоглобіни.

Синтез гемоглобінів А і F може протікати в тих самих еритроцитах.

## **ДЕСТРУКЦІЯ ГЕМОГЛОБІНУ**

Як у випадку еритрофагоцитозу в великих ендотеліальних клітинах у селезінці, так і при деструкції шляхом фрагментації гемоглобін захоплюється разом із клітиною або фрагментом еритроцита. Оскільки ні в тому, ні в іншому випадку гемоглобін не з'являється в плазмі крові, то це означає, що в нормальних умовах молекула гемоглобіну зазнає більш глибоких змін, розпадаючись на свої компо-



ненти. Про те, що це дійсно так, можна судити хоча б з того, що при трансфузії несумісних еритроцитів спостерігається гемоліз, гемоглобінемія й гемоглобінурія.

Разом з тим відомо, що кінцевим продуктом розпаду молекул гемоглобіну є жовчні пігменти білівердін і білірубін, які більше не використовуються в клітинному метаболізмі. Таким чином, у процесі дезінтеграції молекули гемоглобіну залізо і білок досить ефективно утримуються організмом, тоді як порфірин виявляється непотрібним кінцевим продуктом.

Початковим етапом деструкції молекули гемоглобіну є вплив на неї окислювачів. У результаті такого окислювання залізо гема може переходити із двовалентного в тривалентний стан з утворенням метгемоглобіну. Якщо ж окислюється  $\alpha$ -метинова група порфіринового кільця, то в результаті виходить нестійкий продукт окислювання гемоглобіну, що складається з білівердіну, заліза й глобіну, який отримав назву псевдогемоглобін, холеглобін або вердоглобін. Надалі від такого нестійкого комплексу відщеплюється білівердін. Білівердін шляхом відновлення  $\beta$ -метинової групи перетворюється в білірубін.

Обидва пігменти вже не мають структури порфіринів, у них відкриті ланцюги тетрапіролів. Перетворення порфіринів у жовчні пігменти не показано *in vitro*, однак порфірин, включений у хромопротеїди (протопорфірин IX типу III), деградує кількісно до жовчних пігментів і екскретується як стеркобілін (синонім уробіліногену). У результаті створюється парадоксальна ситуація, при якій:

а) шлях біологічної деградації хромопротеїдів (і головним чином гемоглобіну) приводить практично виключно до жовчних пігментів, але не до порфіринів;

б) вихід стеркобіліну, тим не менше, представляє протопорфірин IX і приблизно кількісно відповідає типу III порфірину, який виробляється в синтетичній або анаболічній фазі.

Вважається, що у людини вагою 70 кг щодня руйнується близько 8 г гемоглобіну і виробляється близько 280 мг жовчних пігментів. Екскреція стеркобіліногену (близько

300 мг) тільки злегка перевищує кількість, одержувану від деструкції пігменту крові. Щодня продукується близько 300 мг порфірину типу III (протопорфірин IX), тоді як тільки 0,1 мг типу III порфірину (копропорфірин III) знайдено в екскреті. Отже, майже весь порфірин типу III, який синтезується, використовується на синтез нового гемоглобіну (і інших хромопротеїдів), заміщаючи деструктований гемоглобін. Кількість порфіринів типу III, синтезованого щодня, майже в 1500 разів більше, ніж порфірину типу I, якого виробляється тільки 0,2 мг у день. У той же час порфірин типу I обмежується майже винятково копропорфірином I, становлячи відношення до типу III як 1 : 1500. Використання порфірину типу III для біосинтезу хромопротеїдів і поява їх як еквівалентних кількостей жовчного пігменту (стеркобіліноген або уробіліноген) пояснює парадокс, що згадувався раніше.

Крім того, щоденне виділення 300 мг жовчних пігментів (які являють порфірин типу III) і 0,2 мг порфірину типу I, що являє нормальний рівень, свідчить про те, що попередниками як уробіліногену, так і копропорфірину I є компоненти еритроциту.

Утворення жовчних пігментів припускає відділення простетичної групи від білка, окисний розрив металопорфірину (відкриття тетрапіролового кільця в положенні  $\alpha$ ) і витяг заліза. Ці реакції імовірно зустрічаються у фагоцитуючих клітинах ретикулоендотеліальної системи, але послідовність окремих етапів не встановлена. Зокрема, невідомо, чи обов'язково відщиплення геміну є першим етапом або до його відщиплення відкривається кільце порфірину, завдяки чому утворюється холеглобін або подібний проміжний метаболіт. Існує думка, що наявність заліза необхідна в порфіриновому кільці перед його перетворенням у жовчний пігмент.

Після відщиплення залізо зв'язується білками й транспортується в кістковий мозок, де й використовується для синтезу гемоглобіну або направляється в місце відкладення резервів заліза. Вивільнюваний глобін деградує і вертається в амінокислотний фонд організму. Білірубін з місць

деструкції гемоглобіну в у вигляді білкового комплексу транспортується до печінки, головним чином з альбуміном або  $\alpha$ - і  $\beta$ -глобуліном.

Ємність білків плазми, що транспортують білірубін, значно вище рівня, знайденого для більшості випадків жовтяниці. З печінки білки видаляються, а білірубін переходить у жовчні проточки й через жовчну протоку у дванадцятипалу кишку.

У травному тракті білірубін перетворюється в уробіліноген, очевидно, під впливом кишкових бактерій. Уробіліноген являє собою суміш трьох безбарвних хромогенів, які при окислюванні перетворюються в організмі пігменти, що становлять групу уробіліну. Вважається, що компоненти цієї групи (мезобілірубіноген і  $\alpha$ -уробіліноген) можуть перетворюватися в стеркобіліноген.

Кількість уробіліногену (окислена форма уробілін), яка екскретується із сечею, за добу в дорослої людини дорівнює 0,5-1,5 мг, а з екскрементами – від 40 до 280 мг у день; більш низькі величини знайдені в немовлят. Однак, крім продуктів деструкції молекул гемоглобіну крові, на утворення уробіліногену йдуть також продукти розпаду молекул м'язового гемоглобіну й інших пігментів порфіринової групи.

### **ФАКТОРИ, ЯКІ ВИЗНАЧАЮТЬ ПРОДУКЦІЮ ГЕМОГЛОБІНУ І ЙОГО ДЕКТРУКЦІЮ**

Середня тривалість життя еритроцита людини й деяких ссавців дорівнює 120 дням, еритроцитів птахів - близько 30 днів, а для лейкоцитів - не більше 13 днів. Ця відносна недовговічність формених елементів крові в порівнянні з іншими клітинами організму ставить досить гостро питання про необхідність вироблення особливих, досить чутливих механізмів, завданням яких є підтримка на певному рівні кількості еритроцитів і лейкоцитів у судинному руслі в точній відповідності із розмірами зменшення кількості клітин у результаті зношування і старіння. За 120 днів життя еритроцит проходить шлях між серцем і різними тканинами тіла, який дорівнює приблизно 100 милям, і

природно, що проходження такого шляху зв'язано зі значним зношуванням.

Вище наводилися дані про кількість гемоглобіну, що руйнується в день, які були отримані на підставі обліку жовчних пігментів, виділюваних протягом дня здоровим собакою і людиною. Для людини вагою 70 кг ця кількість гемоглобіну, що руйнується за день, виявилось рівним у середньому 8,1 г. Природно, що при цьому руйнувалися й еритроцити - носії цього гемоглобіну. Цій кількості гемоглобіну відповідає  $2,7 \times 10^{11}$  еритроцитів за день або приблизно 10 млрд. за годину або 3 млн. за секунду. Для людини вагою 70 кг ця кількість гемоглобіну (8,1 г) становить менш як 1,0% загальної кількості гемоглобіну крові, яка дорівнює 900 г.

Кістковий мозок як орган кровотворення повинен вчасно забезпечити цей збиток. Кістковий мозок у людини становить від 3,5 до 6,0% ваги тіла, будучи одним з найбільших за вагою утворень, яке протягом всього організму життя має безперервно забезпечувати надходження потрібної кількості еритроцитів і лейкоцитів. Очевидно, це найбільш динамічна тканина. Відомо, що в дорослої людини половина кісткового мозку припадає на жовтий, жировий кістковий мозок, а інша половина активна, кровотворна. Однак у випадку крововтрати або з інших причин кількість червоного кісткового мозку може збільшитися й еритропоез може зрости десятикратно. Еритропоез кісткового мозку може зрости в 6 - 8 разів. Темпи еритропоезу, так само як і еритродієрезу, можна виявити за допомогою методу мічених атомів. Показано, що від 70 до 100% уведеного радіоактивного заліза включається в знову утворені еритроцити через 7 - 14 днів після введення, а швидкість обміну заліза еритроцитів становить 0,26 мг на кілограм ваги тіла в день.

При розгляді питання про якісні особливості еритропоезу слід зазначити, що в кров'яному руслі є певна частина еритроцитів, що містить гемоглобін в інактивній формі, головним чином у вигляді карбоксигемоглобіну, метгемоглобіну й сульфгемоглобіну в кількостях, що коливаються

від 2,0 до 12,0% загального гемоглобіну крові. Клінічна практика свідчить про те, що випадки метгемоглобінемії й сульфгемоглобінемії, так само як і спадкоємні форми метгемоглобінемії, зустрічаються нерідко. У всіх цих випадках відхилення від норми пов'язане зі зміною простетичної групи гемоглобіну.

Як раніше відзначалося, існує немало фактів, що стосуються особливостей гемоглобіну, пов'язаних зі зміною білкової частини молекули гемоглобіну. Зокрема, відзначені захворювання, як, наприклад, анемія із серповидними еритроцитами, характерною рисою яких є гемоглобін зі зміненою білковою частиною молекули. Ця обставина призвела до виявлення ряду порушень саме в глобіновій частині гемоглобіну, які стали позначати на відміну від гемоглобіну дорослої людини ( Adult-A), гемоглобіну плода ( Fetal-F) і аномального гемоглобіну серповидних еритроцитів ( Sickle-S), як гемоглобіни C, D, E, гемоглобін G, гемоглобін H та ін.

Всі захворювання, пов'язані з порушенням молекули гемоглобіну, класифікуються як прояви «молекулярної хвороби». Особливості всіх аномальних гемоглобінів піддаються вивченню, як відносно амінокислотної сполуки, особливостей електрофорезу, так і клінічних і гематологічних особливостей.

Однак, крім якісних особливостей еритропоезу, що призводять до тих або інших патологічних порушень, варто торкнутися кількісної характеристики діяльності кісткового мозку. Кістковий мозок реагує не тільки на такі зміни, які пов'язані зі змінами кількості крові в організмі, наприклад у випадку крововтрат, але також і при особливих фізіологічних станах, як вагітність у ссавців або перебування тварини в умовах зниженого парціального тиску кисню, коли організм відчуває нестачу кисню. У всіх випадках значно збільшується кількість крові в організмі. Так, наприклад, у період вагітності кількість крові в організмі матері збільшується на 20-30% у порівнянні з вихідним рівнем.

## ОБМІН ЗАЛІЗА

Досліди з вивчення порфіринового обміну дають підставу припускати, що протопорфіринове кільце утворюється не частинами навколо атома заліза, а, навпаки, залізо включається після формування протопорфіринового кільця. Вінільні групи протопорфіринового кільця, очевидно, мають стосунок до включення заліза в протопорфірин, однак поки що нічого не відомо про ферментні системи, пов'язані із процесом включення заліза. Два бічні ланцюги пропіонової кислоти, з іншого боку, визначають хід реакції приєднання гема до глобіну, орієнтуючи його й тим самим сприяючи приєднанню. Нарешті, дві негативно заряджені карбоксильні групи з'єднуються із двома позитивно зарядженими групами глобіну, можливо із групами аргініну.

Незважаючи на те, що зараз ще не ясні біохімічні механізми включення заліза в протопорфірин, є великий фактичний матеріал, що характеризує особливості обміну заліза в організмі.

Дані дослідів свідчать про те, що в організмі дорослої людини, наприклад, утримується близько 4,0-5,0 г заліза, що існує у вигляді комплексних сполук з білками. Серед цих сполук основне місце займає група білків, складовою частиною яких є залізопротопорфіриновий комплекс; в інших білках залізо не пов'язане з порфіриновим кільцем.

Концентрація каталази в тканинах, багатих на каталазу, дорівнює для печінки 0,5 мг/г і для еритроцитів 1,5 мг/г. Концентрація феритину 0,9 мг/г печінки. Сидерофілін у нормі становить близько 100 в Fe на 100 см<sup>3</sup> плазми.

Понад 76% усього заліза припадає на частку хромопротеїдів, простетичною групою яких є гем (гемоглобін крові, м'язів, цитохром С, каталаза) і близько 16,5% - на частку двох залізопротеїнових комплексів (не дериватів гема) - феритину й сидерофіліну (або  $\beta_1$ -псевдоглобуліну). Відкриття цих двох спеціалізованих видів білка й виявлення їхньої функції є одним зі значних досягнень у цій галузі за останні роки, особливо якщо врахувати, що загальні за-

паси заліза в людини, придатні для кровотворення, визначаються приблизно в 1,2 - 1,5 г.

Феритин був описаний в 1934 р. М. Лауфбергером, який виділив його із селезінки й печінки коня, і отриманий у вигляді кристалів залізопротеїну в 1937 р.

Феритин являє собою залізо-білкову сполуку, яка складається з гомогенної білкової частини «апоферитину», що має молекулярну вагу 460 000 і залізовмісної частини, приблизно емпіричної сполуки ( $[\text{FeOОН}]_8 \text{FeOPO}_3\text{H}_2$ ), міцно пов'язаної з білковою частиною. Кристали феритину, отримані за допомогою  $\text{CdSO}_4$ , мають бурий колір і можуть містити заліза від 17,0 до 23,0% сухої ваги, з варіабельним вмістом гідроксизаліза, що визначає негомогенність феритину. Гідрокси-фосфатне залізо має форму міцел, міцно фіксованих на поверхні білка. Залізо може видалятися з білка відновними агентами, такими, як гідросульфід, без денатурації білка. Білок, позбавлений залоза й названий апоферитином, безбарвний. Білок кристалізується з  $\text{CdSO}_4$ , як і феритин. Кристали білка безбарвні. Залізо феритину має унікальні властивості, характеризуючись трьома не спареними електронами, завдяки чому в ньому спостерігаються магнітометричні особливості в порівнянні з усіма іншими формами заліза організму, для яких характерно наявність 5 не спарених електронів. Уперше знайдений у селезінці, класичному органі деструкції крові, феритин є присутнім також у нирках, червоному кістковому мозку, печінці й кишечнику. Особливий інтерес являють два останні органи. У людини найбільш висока концентрація феритину в печінці (0,1 мг на 1 г ваги печінки), яка містить більшу частину всіх його запасів, що становлять 3,0 г.

Немає даних про міграцію феритину (через кров або лімфу) з одного органу в інший.

Добре встановленою функцією феритину є зв'язування більших кількостей заліза, перетворюваного в гідроксид заліза, що складається із дрібних міцелярних одиниць з великою величиною поверхні. Залізо, яке міститься в цих міцелах, може ставати транспортбельним із клітини, по-

передньо перетворюючись у феро-іон. Міцели ж гідроксиду заліза самі по собі нерозчинні. Однак, приєднуючись до білка апоферитину й утворюючи комплексну сполуку, феритин стає розчинною молекулою. Збільшення апоферитину і його зменшення йдуть паралельно збільшенню або зменшенню вмісту заліза. Таким чином, якщо потрібно інтенсифікувати синтез гемоглобіну в кістковому мозку, то залізо й амінокислоти печінки мобілізуються шляхом деструкції феритину й інших резервних білків. Феритин належить до категорії біологічно активних речовин, які володіють гіпотензивною активністю.

У нормальних умовах залізо надходить в організм тільки як складова частина їжі, що абсорбується через кишкову стінку. Показано, що може абсорбуватися тільки іонне залізо. У людини 4 феро-іони абсорбуються легше від тривалентних фери-іонів.

Багато досліджень присвячено характеристиці харчових речовин як джерел заліза, однак технічні труднощі при вимірі абсорбції заліза з їжі такі великі, що багато опублікованих даних мають досить обмежену цінність.

Вважається, що гарними джерелами діетарного заліза є печінка, яловичина, яйця, сухі фрукти, чорна патока. При вивченні особливостей шпинату і яловичини було знайдено, що абсорбція заліза в першому випадку становила 11 - 14, у другому - 21%.

Залізо, що додається до хліба в їжі зміцнювальних раціонів, також служить значним джерелом заліза.

Додавання радіоактивного заліза в розчини для вирощування рослин, а також ін'єкції цього заліза піддослідним курям дозволили судити про кількісну характеристику надходження заліза із продуктів, приготовлених із цих рослин і курей.

На підставі детального аналізу даних, отриманих за допомогою радіоактивного заліза, встановлено, що кількість заліза, абсорбованого із їжі та видаленого з екскрементами із організму, у нормальних людей не перевищує 10% від заліза, яке надходить до організму з їжею. Інтенсифікація засвоєння заліза досягається лише при доданні відносно



великих кількостей свіжого соку лимонів (200—250 см<sup>3</sup>). Подібний ефект виходить при використанні аскорбінової кислоти, яка, очевидно, підсилює відновлення фери-заліза у феро-форму. Абсорбуватися залізо може уздовж всієї довжини шлунково-кишкового тракту, однак основним місцем є дуоденальна ділянка, внаслідок того що тут відносно низька зона рН, що охороняє від перетворення феро-заліза у фери-залізо.

Значення НСІ шлункового соку довгий час було предметом обговорення, однак згодом виявилось, що додавання НСІ до їжі не збільшує абсорбції заліза.

Залізо відіграє важливу роль у житті організму не тільки тому, що є основним компонентом гемоглобіну крові й м'язового гемоглобіну, але головним чином тому, що міститься в кожній клітині організму у вигляді компонента тканинних окисних ферментів - каталази, пероксидази, цитохромів і цитохромоксидази. Тому зрозуміло, що залізо ощадливо використовується організмом, однак невірна думка, що залізо втрачається організмом тільки при крововтратах.

За допомогою міченого заліза встановлено, що загальна кількість заліза, яка втрачається через екскременти, шляхом екскреції слизової кишечника, злущуванням клітин слизової або з виділенням жовчу, виявилось, рівним 0,33-0,52 мг за день у нормальної здорової людини. Винятково малі кількості заліза губляться із сечею і ще менші – з потом.

Загальні втрати заліза зі шкірної поверхні при нормальних умовах, очевидно, не перевищують 0,5 мг у день.

Таким чином, дані, отримані на дорослих чоловіках, свідчать про те, що втрати заліза шляхом екскреції коливаються від 0,5 до 1,5 мг за день. Втрати крові при менструаціях через кожні 28 днів коливаються від 35,0 до 70,0 см<sup>3</sup>, що становить у середньому втрату заліза від 0,5 до 1,0 мг за день.

За період вагітності приблизна втрата заліза з боку материнського організму становить близько 725 мг (з них близько 400 мг доводиться на частку плода, близько 150

мг на частку плаценти й 175 мг відходить із крововтра-тою), або в середньому близько 2,7мг за день протягом всієї вагітності.

Протягом лактації потреби в залізі становлять близько 0,5 мг за день. Таким чином, щоденна потреба здорової жінки в залізі становить близько 2 мг, збільшуючись у період вагітності до 3 мг і більше.

Ріст організму пов'язаний з підвищеною потребою в залізі у зв'язку зі збільшенням кількості крові в організмі, збільшенням маси м'язів, що у свою чергу пов'язане з різким посиленням синтезу м'язового гемоглобіну, а також клітинних дихальних ферментів.

Оскільки тіло немовляти містить близько 0,5 г заліза, а дорослий організм близько – 4,0-5,0 г, то протягом перших 20 років життя потрібно накопичити 3,5-4,5 г заліза. У середньому це становитиме від 0,18 до 0,22 г на рік, або близько 0,4-0,6 мг на день. Більша частина або всі запаси заліза, утворені в результаті деструкції еритроцитів, очевидно, використовуються для біосинтезу гемоглобіну.

Щодня в людини середнього віку в результаті деструкції еритроцитів утворюється близько 20 мг заліза. Кількість заліза, що надходить у середньому при нормальній дієті, дорівнює 12,0-15,0 мг на день. Заліза, яке нормально абсорбується (10,0% діетарного заліза) достатньо для підтримки позитивного балансу дорослого чоловіка, однак у зростаючої дитини або в дорослої жінки в період вагітності цей баланс підтримувати суцужніше. Відзначається, що в пацієнтів, що страждають на анемію, яка пов'язана з нестачею заліза, спостерігається більш ефективна абсорбція заліза, а екскреція його нижче норми. На відміну від інших елементів кількість заліза в організмі регулюється таким шляхом, що надлишкові кількості його не абсорбуються. Шлунково-кишкова мукоза має спеціальний механізм для регуляції надходження заліза. Клітини мукози запасають ферро-залізо в клітини. За допомогою міченого заліза показано, що регуляторний механізм, або «мукозальний блок», існує і що мукозальні клітини пристосовані

накопичувати залізо залежно від потреб організму й попереднього надходження заліза з їжею.

У результаті годівлі залізом у мукозі утворюється феритин. Так, при годівлі їжею, що містила залізо, у морських свинок спостерігалось збільшення вмісту феритину, особливо помітним у дуоденальній ділянці мукози. Через 3-4 години після годівлі разовою дозою заліза вміст феритину збільшувалося, досягаючи максимуму через 7 годин, а потім протягом 2-5 днів знижувалося до вихідного рівня. Дистальні ділянки кишкового тракту виявилися менш ефективними в продукції феритину.

Установлено також, що нирки відіграють важливу роль в утриманні не тільки заліза, але й гемоглобіну. Відомо, що в нормальних умовах печінка видаляє вільний гемоглобін із током крові. Однак якщо ін'єкувати гемоглобін у такій концентрації, що печінка не зможе швидко весь його видалити, то деяка кількість видаляється через гломерули, і ниркові епітеліальні клітини каналців утримують цей гемоглобін. Утримання заліза, одержуваного в результаті введення більших доз гемоглобіну, може досягати в нирках від 4,6 мг у номері до 35-45 мг на 100 г свіжої тканини. Було виявлено, що розщеплення гемоглобіну відбувається після його реабсорбції епітеліальними клітинами каналців. Деструкція гемоглобіну здійснюється способом, що описаний для гемоглобіну у фагоцитарних клітинах. Встановлено також, що залізо, що звільняється при декомпозиції гемоглобіну в каналцевих клітинах, зв'язується у вигляді феритину. Нітроперитонеальна ін'єкція гемоглобіну миші свідчить про те, що кількість феритину, який утворюється в нирках, пропорційна кількості введеного гемоглобіну.

Становить інтерес питання про взаємини феритину й транспорту заліза через плаценту в період внутрішньоутробного розвитку ссавців.

Відомо, що залізо з материнської крові транспортується в кров плода завдяки селективній проникності й руху проти концентраційного градієнта, аналогічно тому, що спостерігається при абсорбції заліза мукозою. Мати постачає

плід залізом, абсорбуючи його з більшою швидкістю, ніж у нормі; залізо транспортується більш легко током крові матері внаслідок збільшення сидерофіліну. Було показано, що залізо через плаценту транспортується проти концентраційного градієнта. Так, при народженні в сироватці плода концентрація заліза дорівнювала 147  $\gamma$ -%, тоді як у сироватці матері тільки 80  $\gamma$ -%. Однак залізо зв'язувальна ємність сироватки (тобто межа, при якій сидерофілін може бути насичений залізом) дорівнювала 226  $\gamma$ -%, а в материнському організмі 446  $\gamma$ -%.

Вважається, що деструкція материнських еритроцитів у плаценті може бути важливим джерелом заліза, оскільки в тканинах плаценти був виявлений феритин, і це тим більш імовірно, що плацента, як відомо, містить гемолізину.

Слід зазначити, що основним депо заліза вважався гемосидерин, речовина невідомого складу, що включає колоїдальний гідроокис заліза, вміст якого досягає 55%. Звичайно поява гемосидерину було пов'язане з порушенням обміну заліза.

Зараз думають, що гемосидерин являє собою відхилення від норми в характері відкладення заліза в тканинах, крім феритину.

Міцели гідроокису заліза, пов'язані з феритином, замість звичайних дрібних полімерів стають не нормально великими, мікроскопічно помітними після забарвлення. Це може спостерігатися при занадто швидкому надходженні заліза в тканини, особливо якщо тканини вже насичені феритином, залізо може утворити гранули. Очевидно, це залізо менш придатне для потреб організму, ніж залізо феритину. Втім, ця остання точка зору розділяється не всіма дослідниками.

*Сидерофілін і транспорт заліза.* Відтоді, як був виділений специфічний білок, який зв'язує залізо і який зветься різними авторами як сидерофілін, трансферин,  $\beta$ -глобулін, різко змінилися погляди на транспорт заліза в плазмі. Одержали пояснення багато мало, колись зрозумілі факти, наприклад ін'єкція заліза, що викликала токсичний ефект.

Сидерофілін був отриманий у кристалічному вигляді. На його частку доводиться 3,3% загальної кількості білків плазми. Його молекулярна вага дорівнює 90 000, концентрація в плазмі становить 0,25  $\gamma$  на 100  $\text{см}^3$  ( $2,8 \times 10^{-5}$  М/л), а загальна його кількість у плазмі близько 7,5 г. У нормі концентрація заліза в плазмі близько 100  $\gamma$  на 100  $\text{см}^3$  крові, причому ця величина становить лише 32% можливий «ємності» сидерофіліну.

Залізо зв'язуюча ємність («латентна ємність») сидерофіліну дорівнює  $315 + 3,3 \gamma$  на 100  $\text{см}^3$ , відповідає 2 М заліза на 1 М сидерофіліну.

Отже, звичайно тільки 3 мг заліза ( $1\gamma/\text{см}^3 \times 3000$ ) переносяться в плазмі, тоді як ємність сидерофіліну по транспорті заліза в три рази більше, тобто близько 9 мг. Отже, ємність плазми як транспортної системи, що переносить залізо, фізіологічно обмежено. Досить, наприклад, людині вагою 70 кг інтравенозно ін'єкувати тільки 6 мг заліза, щоб вийшло тимчасове перевантаження, що може бути токсичним. Цим пояснюється «стеля» концентрації заліза близько 290  $\gamma$  на 100  $\text{см}^3$  плазми, яка вказує на високу потенційну токсичність заліза, що вводиться інтравенозно або парентерально у вигляді солей заліза.

Втім, є дані, що середня величина загальної залізо зв'язуючої ємності сироватки становить 300, 315 і 359  $\text{мкг}\%$ . Ця величина відповідає 0,24—0,28 г трансферину на 100  $\text{см}^3$  сироватки.

У нормі вміст заліза в плазмі коливається, за одними даними, від 50 до 180  $\text{мкг}\%$ , за іншими - у середньому 143  $\text{мкг}\%$  для чоловіків і 117 для жінок, тоді як за третіми даними середня величина його становить  $104,7 + 3,4 \text{ мкг}\%$ . Відзначаються також добові коливання вмісту заліза в плазмі.

Вміст заліза в сироватці крові пупкового канатика до моменту народження високий і коливається від 173 до 193  $\text{мкг}\%$ , однак через 12 годин була виявлена гіпоферія.

Рівень вмісту заліза в плазмі крові визначається рівнем абсорбції заліза з кишечника й надходженням продуктів деструкції гемоглобіну, а також кількістю заліза, викорис-

товуваного кістковим мозком для біосинтезу гемоглобіну. Уважається, що в здоровій людини щодня надходить і залишається в плазмі близько 27 мг заліза, причому близько 21 мг утворюється в результаті деструкції еритроцитів і залишається у вигляді первинних запасів заліза, а 6 мг доводиться на частку заліза, що надходить із травного тракту.

При введенні солей заліза рівень його в плазмі підвищується протягом першої напівгодини, досягаючи максимуму через 2,5-5 годин, і знижується до вихідного через 12-18 годин.

Мічене залізо виявляється в еритроцитах через 4 години після годівлі, а через 4-7 днів виявляється включеним у молекулу гемоглобіну.

Ємність плазми щодо зв'язування заліза збільшується при гострих і хронічних крововтратах, а також при вагітності, тоді як при гострих і хронічних інфекціях, перниціозній анемії, гемолітичній анемії та уремії ємність плазми зменшується.

Однак інтравенозне введення заліза не призводить до збільшення залізоzv'язуючої ємності плазми, а дорівнює концентрації в ній заліза. Очевидно, надлишок заліза в цьому випадку швидко виводиться із судинного русла.

Шляхи міграції заліза в організмі наочно відбивають дані, що стосуються особливостей обміну заліза в організмі. Тільки частина заліза їжі в нормі проникає через шлунково-кишковий бар'єр. Основними пунктами міграції заліза є шлунково-кишковий тракт, плазма крові, печінка й кістковий мозок. Виділяють два цикли:

А) цикл, який характеризується наявністю ланок, що забезпечують абсорбцію, транспорт, резерви й екскрецію (залізо в жовчі);

В) цикл, який характеризується наявністю резерву, транспорту й вогнищ включення заліза в різні структури (еритроцити, м'язовий гемоглобін, клітинні пігменти).

Печінка займає центральне положення в обох циклах. Підкреслюється важлива роль білків, що забезпечують

транспорт і резервування заліза (  $\beta_1$ -псевдоглобулін і феритин).

Важливо підкреслити, що абсорбція заліза їжі в кишечнику являє собою процес, у нормі спрямований на обмеження надходження в кров надлишкових кількостей заліза, про що свідчать також співвідносні величини рівня хромопротеїдів, феритину й  $\beta_1$ -псевдоглобуліну в крові.

### **ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ВМІСТУ ГЕМОГЛОБІНУ**

При народженні дитини, кров пуповини містить від 140 до 190 г/л гемоглобіну, але в перші години після народження цифри можуть підвищуватися до 165-225 г/л. Через два-три дні показники гемоглобіну падають і до двох тижнів – місяця стають, близько 160 г/л. Після першого місяця життя дитини вміст гемоглобіну знижується до 100 - 130 г/л. До 1 року гемоглобін дорівнює 120 г/л. Остаточ-но його рівень устанавлюється до часу статевої зрілості організму.

Зниження вмісту гемоглобіну на 2-3 місяці життя дитини є фізіологічною анемією, причинами якої є інтенсивне зростання дитини й недостатнє екзогенне забезпечення його залізом, що пов'язане з особливостями вигодовування. У цьому віці, з огляду на інтенсивний обмін заліза, аліментарні дефекти можуть призвести до розвитку залізодефіцитної анемії.

У недоношених дітей вміст гемоглобіну нижче, ніж у доношених, наступне його зниження відбувається швидше і є більш вираженим (до 80-100 г/л), причиною чого є дефіцит заліза. Після шестимісячного віку показники гемоглобіну в недоношених дітей досягають величин доношених.

На вміст гемоглобіну у фізіологічних умовах впливає стать (за винятком дітей раннього віку): у чоловіків показники гемоглобіну трохи вище ( 130-160 г/л), ніж у жінок ( 120-140 г/л). Добові коливання гемоглобіну становлять до 10-20%, тому його необхідно визначати в один і той же час доби.

У нормі незначні кількості гемоглобіну містяться також і в плазмі - до 10-40 мг/л крові (так званий вільний гемоглобін). При важкому фізичному навантаженні його рівень зростає в 3-5 разів. У плазмі гемоглобін зв'язується із плазменим білком гаптоглобіном, утворюючи гемоглобін-гаптоглобіновий комплекс. Гаптоглобіни здатні зв'язувати від 800 до 2000 мг гемоглобіну в 1 л плазми.

Фізіологічна роль гемоглобін-гаптоглобінових комплексів - це зменшення втрат гемоглобіну через нирки і збереження заліза в організмі.

## **ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОГО КОНТРОЛЮ**

1. Які основні функції крові в організмі?
2. Що собою являє плазма крові?
3. Дайте характеристику еритроцита.
4. Дайте характеристику молекули гемоглобіну.
5. Дайте характеристику карбоксигемоглобіну.
6. Дайте характеристику метгемоглобіну.
7. Дайте характеристику вердоглобіну.
8. Чим обумовлена здатність крові зв'язувати вуглекислоту?
9. Які форми зв'язування вуглекислоти виділяють?
10. Особливості транспорту вуглекислоти в капілярах, легенях і еритроцитах.
11. Дайте характеристику першого періоду гемопоезу.
12. Особливості кровотворення в селезінці.
13. Механізм визначення тривалості життя еритроцитів.
14. Дайте характеристику проеритробласту.
15. Охарактеризуйте стадію базофільного еритробласту.
16. Роль гліцину в біосинтезі гемоглобіну.



17. Характеристика порфобіліногену.
18. Характеристика і значення уропорфірину й копропорфірину.
19. Особливості синтезу гемоглобіну у внутрішньоутробному періоді.
20. Вікові зміни фетального гемоглобіну.
21. Вікові зміни дорослого гемоглобіну.
22. Дайте характеристику початкового етапу деструкції гемоглобіну.
23. Що є кінцевим продуктом деструкції гемоглобіну?
24. Характеристика перетворень білірубіну в травному тракті.
25. Які фактори впливають на еритропоез?
26. Дайте характеристику феритину.
27. Які джерела заліза виділяють?
28. Які фактори збільшують засвоєння заліза в організмі?
29. Значення заліза в житті організму.
30. Які втрати заліза і його потреби для організму?
31. Вікові зміни обміну заліза.
32. Роль мукози в регуляції вмісту заліза.
33. Особливості транспорту заліза через плаценту.
34. Сидерофілін, його структура та вміст.
35. Вплив сидерофіліну на транспорт заліза в плазмі.
36. Основні пункти міграції заліза в організмі.

## РОЗДІЛ 3. ПАТОЛОГІЇ ОБМІНУ ГЕМОГЛОБІНУ

Порушення обміну гемоглобіну можуть викликати такі причини:

- 1.Порушення біосинтезу гемоглобіну:
  - а) при дефіциті заліза (залізодефіцитні анемії),
  - б) при порушенні синтезу протопорфірину IX (протопорфірії),
  - в) при аномалії глобінової частини гемоглобіну (таласемії й гемоглобінопатії).

2.Порушення транспорту й виділення гемоглобіну.

3.Порушення утворення похідних гемоглобіну.

Анемії. Під *анемією* розуміють патологічний стан, що характеризується зменшенням кількості еритроцитів і (або) гемоглобіну в одиниці об'єму крові.

Деякі види анемії передаються в спадщину – це таласемія, серповидна анемія й сфероцитарна анемія.

### ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНІ АНЕМІЇ

Існують дві форми дефіциту заліза – латентний дефіцит заліза, тобто ізольований дефіцит заліза в тканинах без анемії, і залізодефіцитна анемія.

Залізодефіцитні анемії є розповсюдженою патологією серед дорослого і дитячого населення. У дитячому віці виділяють два періоди, для яких характерна висока частота залізодефіцитних анемії: це перші два роки життя, коли залізодефіцитна анемія реєструється в 40% випадків, і пубертатний період, у якому анемія спостерігається в 1/3 дітей. Поширеність дефіциту заліза серед дітей у цілому становить 32,4%. У дітей перших трьох років дефіцит заліза відзначений у половини, дошкільного віку – в 1/3 і 1/4 обстежених. У дітей раннього віку при залізодефіцитних станах усмоктування заліза не збільшується, а, навпаки, зменшується. Це пов'язано з тим, що в засвоєнні заліза з молока беруть участь залізовмісні ферменти кишечника, синтез яких в умовах дефіциту знижений. Із загальної кі-

лькості харчового заліза, яке надходить в організм, у нормальних умовах всмоктується 10%. Причому залізо краще всмоктується з м'ясних продуктів ( 9 – 22%), що містять гемове залізо, і гірше – з рослинних (0,4 –5%), де є негемове залізо.

Причини залізодефіцитних анемії у дітей:

1. Недостатні запаси заліза.
2. Підвищені потреби організму в залізі, при інтенсивному зростанні, коли навіть нормальне надходження заліза з їжею не забезпечує потреби швидко зростаючого організму.
3. Підвищені втрати заліза з організму. У дітей нормальна втрата заліза становить на першому році життя 0, 07-0,1 мг, в 1–4 роки – 0,15 мг, в 5-8 років – 0,2 мг, в 9-12 років – 0,3 мг; у період статевого дозрівання в хлопчиків – 0,5 мг, у дівчаток – 1-3 мг за добу.
4. Порушення усмоктування й транспорту заліза. Порушення усмоктування заліза обумовлено патологією травного тракту, запальними процесами - ентерит, ентероколіт, гастроентерит. Порушення засвоєння заліза відзначається в дітей, що страждають ексудативно-катаральним діатезом.
5. Порушення регуляції обміну заліза, обумовлене впливом ендогенних факторів. Спостерігається в дітей пубертатного віку, що пов'язане з гормональним дисбалансом.
6. Недостатнє надходження заліза з їжею.

Гематологічна картина при анемії характеризується зменшенням кількості еритроцитів у крові, зменшенням кількості гемоглобіну в крові і дегенеративних змінах еритроцитів.

Клінічні симптоми залізодефіцитної анемії з'являються не відразу й наростають поступово протягом тривалого часу.

Характерними симптомами є: блідість шкірних покривів, зниження апетиту, порушення сну, підвищення стомлюваності, м'язова слабкість, головний біль, запаморочення, тахікардія, задишка при фізичних навантаженнях. Діти

стають дратівливими, у школярів знижується увага, успішність. Може спостерігатися перекручення апетиту, діти їдять неїстівні речовини - землю, глину, крейду, пісок. У дівчинок пубертатного віку відзначається симптом пагофагії - уживання великої кількості льоду, споживання їжі в замороженому виді.

## ГЕМОГЛОБІНОПАТІЇ

При порушенні ферментних систем або дефіциті речовин, необхідних для синтезу гемоглобіну, може відзначатися патологія його обміну.

Проявом патології білкового компонента гемоглобіну є гемоглобінопатії, або гемоглобінози. До гемоглобінопатій відносять серповидну анемію й таласемію.

При гемоглобінопатіях у крові виявляють один або кілька аномальних гемоглобінів, що є наслідком генетичних, спадково обумовлених порушень. Ці порушення призводять до зміни кількісної або якісної амінокислотної сполуки глобіну, тобто супроводжуються порушенням швидкості синтезу ланцюгів нормального гемоглобіну або зміною його первинної структури. За рахунок заміни якоїсь амінокислоти в бета-поліпептидному ланцюзі з'являються структурно аномальні гемоглобіни - С, D, E.

Гемоглобінопатії поширені серед населення Африки, узбережжя Середземного моря, тропічних областей Південно-Східної Азії.

*Таласемія* (уроджений лептоцитоз) є спадковим порушенням утворення гемоглобіну, являє собою гемоглобінопатію, вид гемолітичної анемії. Відбувається постійне утворення фетального гемоглобіну, не властивого організму старше 1 року й дорослому до 90%. Симптоми проявляються в перші дні або тижні життя, але частіше виникають у перші місяці життя. Перший симптом - блідість, поступово збільшується живіт за рахунок збільшення печінки й селезінки. Розвивається анемія. Захворювання прогресує й закінчується смертельним результатом, і виникає він тим раніше, чим раніше виникла анемія.

*Серповидноклітинна анемія* ( S-гемоглобінопатія) належить до захворювань, при яких замість нормального гемоглобіну А синтезується патологічний гемоглобін S, який відрізняється від гемоглобіну А тим, що в бета-ланцюзі амінокислот молекула глутамінової кислоти заміщена молекулою валіну, еритроцити набувають форму серпа або банана, а сам гемоглобін S випадає в еритроцитах у вигляді кристалів. Цим пояснюється змінена електрична рухливість і змінений електричний заряд гемоглобіну, що зумовлює можливість деконфігурації, склеювання та гемолізу еритроцитів. Серповидна анемія характеризується генетичним аспектом. Причиною хвороби є мутація гена, що відповідає за синтез Hb. Захворювання успадковується з неповним домінуванням, а гомозиготи хворіють у важкій формі анемії.

Захворювання широко розповсюджене серед негрів, на Близькому Сході, Індії й виникає тільки в гомозиготних носіїв. Протікає важко і до 10 річного віку закінчується летальним результатом.

*Гемоглобінопатія С*, при якій гемоглобін С відрізняється від гемоглобіну А тим, що в четвертому пептиді бета-поліпептидного ланцюга перша за порядком амінокислота – глутамінова – замінена лізином. Захворювання протікає доброякісно та на загальний розвиток, ріст організму й тривалість життя не впливає.

## ПОРУШЕННЯ ТРАНСПОРТУ Й ВИДІЛЕННЯ ГЕМОГЛОБІНУ

При внутрішньосудинному гемолізі еритроцитів у плазмі надходить велика кількість гемоглобіну, який зв'язується гаптоглобіном. Крім пов'язаного з білками гемоглобіну, в плазмі виявляється і вільний гемоглобін, якщо ємність гаптоглобіну вичерпується. При вмісті вільного гемоглобіну понад 1г на 1 л крові він фільтрується із плазмою в нирках і потрапляє в сечу, що супроводжується появою симптому гемоглобінурії, тому що нирковий епітелій не в змозі реабсорбувати весь вільний гемоглобін, який надходить у ниркові каналці.

Похідні гемоглобіну, що утворюються в незначних кількостях у здоровому організмі, можуть накопичуватися або надмірно утворюватися при різних патологічних станах і захворюваннях.

*Карбоксигемоглобін.* Оксид вуглецю (II) має більшу спорідненість до гемоглобіну, ніж кисень, тому дуже токсичний для організму.

*Метгемоглобін,* утворюється в нормі – фізіологічна метгемоглобінемія. Його рівень в організмі може підвищуватися при захворюваннях серцево-судинної системи, злоякісних пухлинах, опіковій хворобі.

*Сульфгемоглобін,* на кожний атом заліза приєднується атом сірки при прийманні лікарських препаратів (сульфаніламідів).

## **ТЕСТОВІ ПИТАННЯ ДЛЯ САМОСТІЙНОГО КОНТРОЛЮ**

1. Які види анемії відносять до спадкових:
  - А. Серповидна;
  - Б. Хлороз;
  - В. Сфероцитарна;
  - Г. Таласемія;
  - Д. Залізодефіцитна.
  
2. Що таке гемоглобінопатія?
  - А. Зменшення вмісту Hb в еритроцитах.
  - Б. Зменшення вмісту Hb у мегалоцитах.
  - В. Порушення первинної структури білкової частини молекули Hb або синтезу окремих ланцюгів глобіну.
  - Г. Дефект структури мембрани еритроцитів.
  - Д. Результат дефіциту фосфоліпідів у мембрані еритроцитів.

3. Які з перелічених патологій належать до гемоглобінопатій?

- А. Серповидна анемія.
- Б. Таласемія.
- В. Хвороба Минковського-Шоффара.
- Г. Хлороз.
- Д. Мегалобластна анемія.

4. Дайте характеристику молекулярних порушень гемоглобіну при серповидній анемії.

- А. У молекулі Hb відбулося амінокислотне заміщення глутаміну на валін.
- Б. Бета-ланцюг глобіну нормальний.
- В. Первинна структура Hb не порушена.
- Г. Розчинність Hb в еритроцитах підвищена.
- Д. Hb випадає в еритроцитах у вигляді кристалів.

5. Дайте характеристику генетичних аспектів патогенезу серповидної анемії.

- А. Причиною хвороби є мутація гена, що відповідає за синтез Hb.
- Б. Успадковується з неповним домінуванням.
- В. Гомозиготи хворіють у важкій формі анемії.
- Г. Гомозиготи хворіють тільки в умовах гіпоксії.
- Д. Гетерозиготи ніколи не хворіють.

6. Дайте характеристику таласемії.

- А. Гемоглобінопатія.
- Б. Мембранопатія.
- В. Гемолітична анемія.
- Г. Придбана анемія.
- Д. Ферментопатія.

7. Назвіть клінічні ознаки анемії.

- А. Тахікардія.
- Б. Блідість.
- В. Задишка.
- Г. набряки.

Д. Гіперемія.

8. Назвіть гематологічні ознаки анемії.
- А. Зменшення кількості еритроцитів у крові.
  - Б. Зменшення кількості гемоглобіну в крові.
  - В. Дегенеративні зміни еритроцитів.
  - Г. Лейкоцитоз.
  - Д. Тахікардія.
9. Яка з перелічених нижче ознак є обов'язковою для анемії?
- А. Зменшення числа еритроцитів в одиниці об'єму крові.
  - Б. Зниження колірного показника крові.
  - В. Зменшення концентрації гемоглобіну.
10. Як називається збільшення кількості еритроцитів вище  $6 \times 10^{12}/\text{л}$ , а гемоглобіну вище 170 г/л?
11. Назвіть можливі причини розвитку залізодефіцитних анемії:
- А. Повторна й тривала кровотеча.
  - Б. Дефіцит вітаміну В6.
  - В. Іонізуюча радіація.
  - Г. Підвищена витрата заліза.
  - Д. Зниження засвоєння заліза.
12. Для залізодефіцитної анемії характерна така картина периферичної крові:
- I Гемоглобін:
- а) підвищений;
  - б) знижений;
  - в) у межах норми.
- II Кількість еритроцитів:
- а) у межах норми;
  - б) підвищена;
  - в) знижена.



III Кольоровий показник:

- а) у межах норми;
- б) знижений;
- в) підвищений.

13. Який процентний вміст Нв від загального в нормі в дитини до моменту народження?

- А. 50 - 70%.
- Б. 70 - 90%.
- В. 10 - 30%.

14. Який процентний вміст Нв від загального в нормі в дорослих і дітей після року?

- А. 2 - 4 %.
- Б. 10 - 30%.
- В. 50 - 70%.
- Г. 70 - 90%.

# ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ

## МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ ГЕМОГЛОБІНУ

Відтоді, як був відкритий гемоглобін і встановлена його роль в організмі, не припинялися дослідження з кількісного визначення цього найважливішого дихального пігменту. У літературі є великий фактичний матеріал щодо визначення концентрації гемоглобіну в крові людини й різних тварин. Втім, матеріал цей отриманий методами різного ступеня точності й тому його не завжди можна порівнювати. Саме внаслідок важливої ролі, яку відіграють методи визначення гемоглобіну в медицині й зоотехнії, вжито багато спроб удосконалити старі методи й створити нові. Однак, незважаючи на значну кількість запропонованих методів, тільки деякі можуть уважатися досить досконалими.

Можна назвати біля десяти методів визначення гемоглобіну в крові, які застосовуються зараз і вважаються найбільш точними. Спектрофотометричний метод, дозволяє визначати кількість гемоглобіну як у крові, так і в плазмі крові шляхом порівняння інтенсивності спектрів поглинання невідомого розчину гемоглобіну зі стандартним.

Одним з найбільш точних і доступних непрямих методів є *визначення гемоглобіну за кисневою ємністю крові*. У досвідчених руках точність цього методу може досягти 0,5%. В основу його покладені факти, про те, що 1,0 г гемоглобіну зв'язує 1,34 см<sup>3</sup> кисню.

Треба, однак, мати на увазі, що цим методом визначається тільки «активний» гемоглобін, потенційно здатний переносити кисень. Відповідні дослідження з визначення гемоглобіну однієї й тої ж проби крові різними методами показали, що існує якась фракція гемоглобіну, що не з'єднується з киснем, так званий «інактивний гемоглобін». Установлено, що кількість інактивного гемоглобіну, визначена в момент узяття проби крові, яка дорівнює 1,29%, зменшується у звичайних умовах до кінця четвертої години до 0,56%.

Іншим газометричним методом є *карбон-монооксидний метод*. Кров, розведена водою, насичується окисом вуглецю. За стандарт беруть 1,0%-ний розчин крові з кисневою ємністю 18,5 об'ємних відсотків (13,8 г гемоглобіну на 100 см<sup>3</sup> крові), що насичують окисом вуглецю й герметично запаюють.

До категорії точних належить і метод *визначення гемоглобіну за вмістом заліза* в пробі крові. Після осадження білків крові сірчаною кислотою кількість заліза визначається шляхом порівняння з забарвленням стандартного розчину відомої концентрації заліза.

З ряду методів, запропонованих для визначення заліза, очевидно, кращим є метод, у якому як основний реагент застосовується хлорид титану.

Уважається, що в плазмі у нормі містяться незначні кількості заліза, не більш як 0,4%. Однак при різного роду анеміях у крові людини його вміст може досягати більше 1,4%. В основі цього методу лежить відомий факт про те, що в молекулі гемоглобіну 0,34% заліза. Отже, точність методу значною мірою визначається величиною вмісту заліза в молекулі гемоглобіну. Труднощі визначення істинної величини вмісту заліза в молекулі гемоглобіну залежить від того, наскільки чисто приготовлений препарат кристалічного гемоглобіну, у якому визначається залізо.

Запропонований також *бензидиновий метод* визначення гемоглобіну в мінімальних кількостях крові. Менш точні, але більш поширені колориметричні методи визначення гемоглобіну. Вони засновані на візуальному або фотоелектричному колориметруванні випробуваних розчинів зі стандартними розчинами оксигемоглобіну або продуктів його перетворення, таких, як солянокислий гематин, лужний гематин, ціан-метгемоглобін, ціангематин, або піридингемохромоген.

Пряме визначення оксигемоглобіну здійснюється за допомогою гемометрів системи Даре, коли забарвлення крові порівнюється з забарвленням диска, що має різну товщину й ступінь червоного забарвлення.

Одним з основних недоліків оксигемоглобінового методу є труднощі, пов'язані з підбором потрібних відтінків фарби в стандарті. При розведенні крові застосовується слабкий розчин  $\text{NH}_4\text{OH}$  для стабілізації забарвлення оксигемоглобіну.

*Солянокисло-гематиновий метод* (один з найбільш розповсюджених) був запропонований Г. Салі ще в 1895 р. Він заснований на перетворенні гемоглобіну крові за допомогою  $\text{N}/10 \text{ HCl}$  у солянокислий гемін, що має буре забарвлення. Інтенсивність забарвлення випробуваного розчину порівнюється зі стандартним розчином солянокислого геміну або зі скляним забарвленим стандартом. Цей метод дуже простий і широко використовується в клініці.

Однак він має ряд істотних недоліків, що впливають на точність визначення гемоглобіну.

Рідкий стандарт із часом міняє забарвлення настільки, що через 18-20 місяців втрачає до 50% первісної її інтенсивності. У присутності гліцерину швидкість вицвітання вповільнюється, і за 10 місяців втрачається лише близько 10% забарвлення. Останнім часом стандартні розчини геміну замінюються забарвленими скляними стандартами. Один з основних недоліків – повільне утворення солянокислого геміну після змішування проби крові й кислоти. Залежно від часу, що минає з моменту змішування крові й кислоти, можна одержати різні величини кількості гемоглобіну для однієї і тієї ж проби крові. Тому точність методу така, що помилка досягає від 5,0 до 40,0%. Тільки при дуже ретельній стандартизації умов визначення можна знизити величину помилки до 5, 0-7,0%.

Значно більше досконалий гемометр Цейса, за допомогою якого виходять у багато разів більш точні результати. На відміну від гемометра Салі, де вирівнювання інтенсивності забарвлення випробуваного розчину зі стандартом досягається додаванням води й немає можливості точно зрівняти забарвлення, у гемометрі Цейса ступінь розведення досліджуваної крові строго постійний. Так само постійний час для утворення солянокислого геміну. 30 мм<sup>3</sup> крові, відмірвані градуйованою піпеткою, розбавляються

N/10 HCl в 66,7 разу (до 2000 мм<sup>3</sup>). По закінченні 5 хв. проводиться колориметрування зі скляним забарвленим стандартом, причому відлік за шкалою можна перевіряти повторно, чого не можна зробити в гемометрії Салі. У випадку ядерних еритроцитів можна відцентрифугувати ядерну каламуть і тим самим уникнути завищених результатів.

У цілому солянокисло-гематиновий метод незручний ще й тим, що при впливі N/10 HCl на кров кислий гемін перебуває скоріше у вигляді колоїдальної суспензії, ніж у вигляді істиного розчину, оскільки частково в опади переходять і білки, і ліпоїди плазми. Ця обставина безсумнівно утрудняє можливість визначення за допомогою фотометрії. У цьому випадку додавання надлишку луку, наприклад 10%-ного NaOH, дає істиний розчин гематину та інших компонентів плазми.

Крім того, показано, що від 2,0 до 12,0% загального гемоглобіну крові циркулює в інактивній формі, головним чином у вигляді карбоксигемоглобіну, метгемоглобіну й сульфгемоглобіну. В лужному розчині при pH 10 ці аномальні форми гемоглобіну перетворюються в гематин, що не спостерігалось при додаванні N/10 HCl. Однак у випадку гемоглобіну немовлят, який має іншу лужну резистентність, помилка може бути значною.

*Цианметгемоглобіновий метод* кількісного визначення гемоглобіну крові заснований на здатності ферицианіду перетворювати залізо гемоглобіну із закисної в окисну форму у вигляді метгемоглобіну, який потім, з'єднуючись із KCN, утворює стійкий пігмент, цианметгемоглобін. Важливою особливістю є те, що обидві ці реакції є швидкими й стехіометричними. У цьому методі використовується розчинник Драбкіна, що складається з 1,0 г NaHCO<sub>3</sub>, 50 мг ціаніди калію, 200 мг K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] і, який розбавляється до літра дистильованою водою. Це прозорий, палеофіолетового кольору розчин. Каламуть у випадку її утворення видаляється, розчин зберігається в коричневому посуді й готується раз на місяць. Концентрація ціаніду в реангенті

така низка, що потрібно не менше чотирьох літрів, щоб викликати летальний ефект у людини.

Високий ступінь точності має *ціан-гематиновий метод*. 0,02 см<sup>3</sup> крові змішується з 1,98 см<sup>3</sup> 0,1 N HCl. Через 10 хв. повністю утворюється солянокислий гематин. Потім додається 2 см<sup>3</sup> 2,0%-ного розчину ціаніду натрію й змішується. Стандартний розчин готується із чистого кристалічного геміну (8,57% Fe), 28,8мг якого зважуються в літровій колбі. Додається 200 см<sup>3</sup> 5,0%-ого розчину ціаніду натрію та водою заповнюється до мітки. Потім колориметрують.

Однак у клінічній і зооветеринарній практиці в роботі використовуються більше прості, хоча й менш точні колориметричні методи, причому одержувані результати часто виражаються у відсотках шкали стандарту (розчину або забарвленого скла). Аналіз такого роду даних часто практично неможливий внаслідок того, що не вказується значення 100% тієї або іншої шкали, оскільки в різних моделях 100% відповідають різні величини.

Можна до цього додати, що в нових моделях Салі 100% шкали відповідає 16,7 г гемоглобіну.

## Лабораторна робота №1

Тема: ВИЗНАЧЕННЯ ГЕМОГЛОБІНУ ЗА МЕТОДОМ САЛІ.

Мета роботи: навчитися працювати з гемометром і визначати гемоглобін за методом Салі.

Кількість гемоглобіну визначається колориметричним методом, тобто шляхом порівняння кольору досліджуваного розчину з кольором стандартів, концентрація яких відома.

Пристрій гемометра Салі. Гемометр Салі являє собою найпростіший колориметр. Прилад має пластмасовий корпус, задня стінка якого зроблена з матового скла, що розсіює світло. У корпус вмонтовані три невеликі скляні пробірки, які видні крізь прорізи. Дві бічні, запаяні з обох кінців, містять стандартний розчин хлориду гематину в гліцерині. Колір рідини в стандартних пробірках відповідає кольору 2% розчину хлориду гематину.

Між двома стандартами вставлена градуйована пробірка. На всіх трьох пробірках нанесені по дві кругові мітки: нижня відповідає місткості 0,2 мл, верхня – 2 мл. Пробірки встановлені на горизонтальній пластині, і при рівності їхніх діаметрів всі контрольні кругові мітки повинні перебувати на одному рівні.

Середня пробірка гемометра має шкалу, що градуйована в грам-відсотках (г%), тобто виражає кількість гемоглобіну в грамах, що втримується в 100 мл крові. Нижня оцінка шкали 2г%, верхня – 23 г%. Ціна однієї поділки шкали 0,2 г%.

До гемометра додається капіляр, що має одну мітку - 0,02 мл (капіляр Салі), гумова трубочка зі скляним накопичувачем, тонка скляна паличка й очна піпетка.

### Реактиви:

- 1) 0,1 н. розчин хлористоводневої кислоти;
- 2) дистильована вода.

Хід визначення. У градуйовану пробірку гемометра наливають 0,1 н розчин хлористоводневої кислоти до нижньої кругової мітки 0,2 мол.

Шкіру пальця дезінфікують, дають їй висохнути й роблять прокол. Першу краплю крові, що виступила, стирають. Злегка надавлюючи на палець, вичавлюють нову краплю.

На суху капілярну піпетку Салі надягають гумовий балон. Кінчик капіляра занурюють у краплю крові й набирають її строго до мітки 0,02 мол. Співвідношення кількості крові й хлористоводневої кислоти повинне дотримуватися точно - 1:10.

Капілярну піпетку занурюють у середню пробірку гемометра й видувають із неї кров на дно пробірки. Неприпустиме утворення при цьому бульбашок. Капіляр треба 2-3 рази промити хлористоводородною кислотою з верхнього прозорого шару рідини. Кров у пробірці ретельно перемішують із хлористоводневою кислотою й залишають на 5 хв. За цей час еритроцити гемолізуються, й гемоглобін перетворюється в хлорид гематину бурого кольору. Після закінчення зазначеного часу в градуйовану пробірку по краплях вносять дистильовану воду. Уміст пробірки розмішують тонкою скляною паличкою. Розведення продовжують до повного збігу кольору рідини в градуйованій пробірці з кольором стандарту. Порівняння кольорів необхідно робити завжди при тому самому джерелі світла, тому що інтенсивність освітлення впливає на результат визначення.

Показання гемометра знімають за нижнім меніском рідини в градуйованій пробірці. Отримана цифра вказує концентрацію гемоглобіну в грам-відсотках. Для того щоб виразити концентрацію гемоглобіну в одиницях Міжнародної системи (СИ), тобто в грамах на літр крові (г/л), потрібно кількість гемоглобіну в г% помножити на 10 [4,6].



## Лабораторна робота №2

Тема: ВИЗНАЧЕННЯ ГЕМОГЛОБІНУ НА ФОТОЕЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРІ.

Мета роботи: навчитися працювати на фотоелектроколориметрі й визначати гемоглобін гемоглобінціанідним методом.

Для одержання точних об'єктивних даних про світлопоглинання застосовують прилади, які мають фотоелементи, - фотоелектроколориметри.

Способи визначення гемоглобіну на ФЕКі засновані на утворенні стійких, забарвлених сполук при взаємодії його з різними речовинами: аміаком, ацетонціангідрином і ін.

Гемоглобінціанідний метод. Гемоглобін, взаємодіючи з ацетонціангідрином, у присутності заліzosиньородистого калію утворює гемоглобінціанід червоного кольору, інтенсивність забарвлення якого пропорційна вмісту гемоглобіну в пробі крові.

Реактиви:

1) трансформуючий розчин, (0,5 мл ацетонціангідрину, 0,2 г заліzosиньородистого калію, 1 г гідрокарбонату натрію  $\text{NaHCO}_3$  розчиняють в 1 л дистильованої води; реактив стійкий, зберігається в посуді з темного скла);

2) стандартний розчин гемоглобінціаніду.

Хід визначення. До 5 мл трансформуючого розчину додають 0,02 мл (капіляр Салі) крові. При цьому кров розводиться в 251 раз. Залишають пробірки на 10 хв при кімнатній температурі.

Фотометрують при зеленому світлофільтрі (довжина хвилі 500-560 нм) у кюветі з товщиною шару 10 мм проти дистильованої води.

Стандартний розчин фотометрують за тих самих умов, що й дослідну пробу.

Розрахунок. Вміст гемоглобіну визначають за графіком, що будується за стандартним розчином гемоглобінціаніду.

Приготовлені розведення фотометрують проти дистильованої води («холоста» проба). Концентрацію гемоглобіну крові можна розрахувати за формулою:

$$Hb = E_{дп} / E_{ст} \times C \times K \times 0,01,$$

де  $E_{дп}$  – екстинція дослідної проби;  $E_{ст}$  – екстинція стандартного розчину;  $C$  – концентрація гемоглобінціаніду в стандартному розчині, мг%;  $K$  – коефіцієнт розведення крові; 0,01 – коефіцієнт для перерахування в грами на літр [4,6].

### Лабораторна робота №3

Тема: ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ І КОЛЬОРОВОГО ПОКАЗНИКА КРОВІ.

Мета роботи: навчитися робити забір крові, працювати з еритроцитарним змішувачем і камерою Горяєва; навчитися робити розрахунки кількості еритроцитів і кольорового показника крові.

Підрахунок червоних кров'яних клітин – важливе дослідження при оцінці анемічних станів.

Реактиви й обладнання: камера Горяєва, еритроцитарний змішувач; фізіологічний розчин; мікроскоп.

Хід визначення. Змішувач для підрахунку еритроцитів являє собою капіляр з ампулою й поділками на нижній частині 0,5 і 1. Ампула змішувача вміщає в 100 разів більше рідини, ніж капіляр до мітки 1 і в 200 разів більше, ніж капіляр до мітки 0,5. Тому над ампулою стоїть цифра 101. У середині ампули міститься кулька для розмішування.

Шкіру пальця дезінфікують, дають їй висохнути й роблять прокол. Першу краплю крові, що виступила, стирають. Злегка надавлюючи на палець, вичавлюють нову краплю. Кров набирають до мітки 0,5 і розводять фізіологічним розчином до мітки 101. Підраховують еритроцити

в камері Горяєва. Спочатку до камери притирають покривне скло до появи кілець. Змішувач струшують, щоб зваж була рівномірною, видаляють зі змішувача 1-2 краплі розчину, що перебував у капілярі. Наступну краплю наносять на поверхню камери так, щоб вона розтекла рівномірно. Надлишки відсмоктують фільтрувальним папером.

Еритроцити підраховують у п'яти великих квадратах (тобто в 80 малих) по діагоналі. Еритроцити пересічені прикордонною лінією підраховуються тільки на двох із чотирьох сторін квадрата.

Кількість еритроцитів обчислюють за формулою:

$$X = \frac{A}{100} \times 10^{12}, \text{ де } A - \text{кількість еритроцитів в п'яти великих квадратах.}$$

Кольоровий показник дає уявлення про кількість гемоглобіну в еритроцитах. Обчислюють його за формулою:

$$КП = \frac{Hb(\text{г}\%) \times 0,6}{2 \times \text{еритроцити}},$$

де цифра кількості еритроцитів записується без значення  $10^{12}$

При постгеморагічній анемії кольоровий показник падає нижче одиниці. Це пояснюється нагромадженням у крові незрілих еритроцитів з незначним вмістом у них гемоглобіну [4,6].

#### **Лабораторна робота №4**

Тема: ВИЗНАЧЕННЯ ОСМОТИЧНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ.

Мета роботи: навчитися визначати осмотичну резистентність еритроцитів.

Реактиви й обладнання: пробірки (24 шт.), штатив, 1% розчин хлористого натрію, дистильована вода.

Хід визначення. Резистентність еритроцитів досліджують за гіпотонічними розчинами хлориду натрію. Втрата гемоглобіну еритроцитами виражена неоднаково. Розрізняють мінімальну й максимальну осмотичну резистентність; у першому випадку гемолізу піддається тільки частина еритроцитів, що мають найменшу резистентність, у другому випадку всі еритроцити втрачають гемоглобін, тобто настає повний гемоліз крові.

В 24 пробірки наливають по 1 мл поступово зменшуваних розведень кухонної солі (з її вмістом від 0,7 до 0,3% і з інтервалом в 0,02%), які виговлені з 1%-ого розчину хлориду натрію (див. табл.)

№ пробірки	1%-вий р-н NaCl (мл)	Дист. вода	№ пробірки	1%-вий р-н NaCl (мл)	Дист. вода
1.	0,70	0,30	13.	0,46	0,54
2.	0,68	0,32	14.	0,44	0,56
3.	0,66	0,34	15.	0,42	0,58
4.	0,64	0,36	16.	0,40	0,60
5.	0,62	0,38	17.	0,38	0,62
6.	0,60	0,40	18.	0,36	0,64
7.	0,58	0,42	19.	0,34	0,66
8.	0,56	0,44	20.	0,32	0,68
9.	0,54	0,46	21.	0,30	0,70
10.	0,52	0,48	22.	0,28	0,72
11.	0,50	0,50	23.	0,26	0,74
12.	0,48	0,52	24.	0,24	0,76

Доцільно щоразу мірною піпеткою ємністю в 1 мл набирати 1%-ого розчину кухонної солі й виливати з неї в першу пробірку 0,70 мл, а в 21-у - решту 0,30 мл. При другому заборі розчину в другу пробірку 0,68 мл, а в 20-у - залишок 0,32 мл і т.д. у такому ж порядку. При доливанні дистильованої води роблять навпаки. Після струшування в кожен пробірку вносять точно по одній краплі свіжої крові. Пробірки струшують, залишають стояти при кімнатній температурі 3-12 годин. Відзначають концентрацію ку-

хонної солі у двох пробірках: у тій, в якій розчин кухонної солі ледь тільки починає забарвлюватися в жовтий колір (гемоліз тільки починається), і в тій, у якій зовсім немає осаду еритроцитів (повний гемоліз)[4,6].

## ЛІТЕРАТУРА

1. Владимирская Е.Б., Володин Н.Н. Регуляция кроветворения и иммуногенеза в перинатальный период // Педиатрия. – 1997. - №4. – С.76-83.
2. Зубарева К.М. Болезни системы крови. – М.: Медицина, 1979. – 120 с.
3. Коржуев П.А. Гемоглобин: сравнительная физиология и биохимия. – М.: Наука, 1964. – 287с.
4. Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследования/ Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1973. – 523 с.
5. Плотицер С.М. Лабораторные диагностические исследования. – К.: Здоров'я, 1965. – 515 с.
6. Посібник до практичних занять з патологічної фізіології / За ред. Ю.В.Биця. – К.: Здоровья,2001. – 400 с.
7. Пятак О.А. Международная система единиц в клинической медицине. – К.: Здоров'я, 1982. – 88с.
8. Резник Б.Я., Зубаренко А.В. Практическая гематология детского возраста. – К.: Здоров'я, 1989. – 400с.
9. Руководство по гематологии: в 2-х т. / Под ред. А.И. Воробьева. – М.: Медицина, 1985.
10. Руководство по клинической лабораторной диагностике. Ч.4. Клиническая биохимия: учебное пособие / Под ред. М.А.Базарновой. – К.: Вища школа, 1980. – 319с.
11. Рябов С.И., Шостка Г.Д. Молекулярно-генетические аспекты эритропоэза. – Л.: Медицина, 1973. – 279 с.

## **ПРЕДМЕТНИЙ ПОКАЖЧИК**

**Анемія** 63,66,  
- залізодефіцитна, 63,  
- серповидноклітинна, 66

**Базофільний еритробласт**, 37  
**Білівердін**, 46  
**Білірубін**, 46

**Вердоглобін**, 29, 46  
**Вуглекислота**, 31, 33

**Гаптоглобін**, 66  
**Гем**, 9, 19, 37  
- структура, 12, 28  
**Гематин**, 4  
**Гематоглобулін**, 4  
**Гематопорфірин**, 12  
**Гемін**, 5, 6, 9  
**Гемоглобін**, 3,4  
- біосинтез, 38  
- дорослий, 22,45, 50  
- деструкція, 46  
- методи визначення, 73  
- серповидний, 23  
- структура, 18  
- фетальний, 22, 45, 50  
**Гемоглобінопатії**, 63, 65, 67  
**Гемоцитопоез**, 34  
**Глобін**, 9, 16

**Еритробласти**, 34, 45  
**Еритропоез**, 35, 50  
**Еритроцити**, 27  
**Етиопорфірин**, 12

Ємність залізовв'язуюча, 57

Залізо, 4, 51

- транспорт, 57

Карбоксигемоглобін, 28, 67

Копорфірин, 43

Лімфопоез, 35

Мезопорфірин, 13

Метгемоглобін, 28,67

Мукоза, 57

Оксигемоглобін, 29, 30

Оксигенація, 30

Порфін, 15

Порфірини, 11, 13, 39, 48

Порфобіліноген, 41, 42

Протопорфірин, 39, 44

Проеритробласт, 37

Сидерофілін, 51, 58

Сульфгемоглобін, 67

Таласемія, 63, 65

Трансферин, 57

Уробіліноген, 47

Уропорфірин, 42

Феритин, 52,57

Хромопротейди, 8



## ВІДПОВІДІ ДО ТЕСТОВИХ ПИТАНЬ

1. А. Серповидна;  
В. Сфероцитарна;  
Г. Таласемія.
  
2. В. Порушення первинної структури білкової частини молекули Нб або синтезу окремих ланцюгів глобіну.
  
3. А. Серповидна анемія.  
Б. Таласемія.
  
4. А. У молекулі Нб відбулося амінокислотне заміщення глутаміну на валін.  
Д. Нб випадає в еритроцитах у вигляді кристалів.
  
5. А. Причиною хвороби є мутація гена, що відповідає за синтез Нб.  
Б. Успадковується з неповним домінуванням.  
В. Гомозиготи хворіють у важкій формі анемії.
  
6. А. Гемоглобінопатія.  
В. Гемолітична анемія.
  
7. А. Тахікардія.  
Б. Блідість.  
В. Задишка.
  
8. А. Зменшення кількості еритроцитів у крові.  
Б. Зменшення кількості гемоглобіну в крові.  
В. Дегенеративні зміни еритроцитів.
  
9. А. Зменшення числа еритроцитів в одиниці об'єму крові.  
В. Зменшення концентрації гемоглобіну.
  
10. Відповідь: еритроцитоз.

11. А. Повторна й тривала кровотеча.  
Г. Підвищена витрата заліза.  
Д. Зниження засвоєння заліза.
12. I - б;  
II - в;  
III - б.
13. Б. 70 - 90%.
14. А. 2 - 4 %.

Навчальне видання

**ПІЛЬКЕВИЧ** Наталя Борисівна  
**РАЗДАЙБЕДІН** Віталій Миколайович  
**БОЯРЧУК** Олена Дмитрівна

**ГЕМОГЛОБІН:  
структура, біохімія та патологія**

*Навчальний посібник  
для студентів вищих навчальних закладів*

Редактор – Боярчук О.Д.  
Комп'ютерний макет – Пількевич Н.Б.  
Коректор – Боярчук Д.І.

---

Здано до складання 16.04.2007р. Підписано до друку  
16.05.2007р. Формат 60X84/16. Папір офсетний.  
Гарнітура Times New Roman. Друк. різнографічний.  
Умов. дрк. арк. 5,6. Наклад.100 прим. Зам. № 416.

---

**Видавництво ЛНПУ імені Тараса Шевченка**  
**«Альма-матер»**  
вул. Оборонна,2, м. Луганськ,91011.  
Тел./факс. (0642) 58-03-20