

УДК 616-074:612.111.11

ГЕМОГЛОБИНЫ ЧЕЛОВЕКА КАК ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ**Кривенцев Ю.А., Кривенцева Л.А.***ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Астрахань, e-mail: agma@astranet.ru*

В статье представлен совокупный анализ современных взглядов мировой литературы на гетерогенную систему гемоглобина человека. Отражено эволюционное происхождение этого белка, его структурные и функциональные особенности, физические и химические свойства, основы номенклатуры и классификации его форм, производных и генетических типов, стадийности их синтеза на разных этапах онтогенеза человека. Представлены современные методы качественной и количественной индикации гемоглобина. Проведен сравнительный анализ современных методик определения этого протеина в биологических жидкостях человека. Обосновано и доказано, что иммунохимические методы регистрации гемоглобина имеют ряд существенных преимуществ перед широко распространенными оптическими методиками, а именно: абсолютную специфичность определения типов белка, точность, надежность, а также высокую диагностическую эффективность. С использованием литературных примеров последних лет доказано большое прикладное медицинское значение основных типов гемоглобина (гемоглобина A₁, плодового и эмбрионального): как важных диагностических и прогностических маркеров, незаменимых в клинической оценке разнообразных патологических состояний. На основе совокупного приведенного материала показана несомненная актуальность создания иммунохимических тестов для регистрации основных типов гемоглобина и их широкого внедрения в медицинскую практику.

Ключевые слова: гемоглобин, типы гемоглобина, количественный анализ, иммунохимия, диагностическая роль

HEMOGLOBINS OF THE HUMAN AS DIAGNOSTIC MARKERS**Kriventsev Yu.A., Kriventseva L.A.***Astrachan State Medical University, Astrachan, e-mail: agma@astranet.ru*

This article presents analysis of the world literature on the heterogeneous system of human's hemoglobin. It contains information about evolutionary origin of this protein, its structural and functional features, physical and chemical properties, the foundations of the nomenclature and the classification of its forms, derivatives and genetic types, the staging of their synthesis at different stages of human ontogenesis. Modern methods of qualitative and quantitative indication of hemoglobin are present. Comparative analysis of modern techniques for the determination of this protein in human biological fluids has been carried out. It has been substantiated and proved that immunochemical methods of hemoglobin registration have significant advantages over widely used optical methods, namely: absolute specificity of protein types determination, accuracy, reliability, and high diagnostic efficiency. Large applied medical value of the main types of hemoglobin (hemoglobin A₁, fetal and embryonic) has been proved with use the literary examples of recent years. Their important diagnostic and prognostic role as markers, indispensable in the clinical evaluation of various pathological conditions has been proved. Demonstrate the importance use of immunochemical tests for recording the main types of hemoglobin, and importance their active introduction into medical practice.

Keywords: hemoglobin, types of hemoglobin, quantitative analysis, immunochemistry, diagnostic role

Крупнейшее событие в ходе эволюции нашей планеты – открытие процесса фотосинтеза – повлекло за собой неизбежное изменение состава земной атмосферы в плане увеличения доли молекулярного кислорода. Появление такого эффективного биологического окислителя, как O₂, дало гетеротрофным организмам возможность более эффективного извлечения энергии органических связей путем дыхания. Последовавшее затем возникновение крупных многоклеточных привело к проблеме транспорта кислорода в ткани биологических систем. Но, поскольку кислород очень плохо растворим в воде (всего 4,9 мл газа в 100 мл H₂O), очевидным решением этой проблемы стало появление гуморальных посредников, доставляющих дыхательные газы по адресу. Таким образом, в ходе эволюционного

прогресса у большинства многоклеточных сформировалась система белковых дыхательных пигментов, главным из которых является гемоглобин (Hb) [1–3].

Гемоглобин (Hb) (от греч. haemo – кровь и лат. globus – шар), красный железосодержащий хромопротеин, обнаруженный у всех эукариотических организмов, от одноклеточных (дрожжи и др.) до беспозвоночных и высших позвоночных животных. Он способен обратимо связывать молекулярный кислород в количестве 20 мг O₂ на 100 мл крови [4]. В биологических системах Hb выполняет две важнейшие функции: а) транспорт дыхательных газов; б) поддержание кислотно-основного равновесия (стоит заметить, что гемоглобиновый буфер является самым мощным в организме (примерно 3/4 от общей буферной емкости крови) [5].

Гемоглобин называют модельным белком, свойства, функции и структура которого наиболее полно изучены по сравнению с другими протеинами человека. Отмечая ключевую роль этого хромопротеина в системе дыхания, непревзойденный гемоглобинолог Макс Перутц назвал Hb «молекулярным легким» [6].

Гемоглобин – внутриклеточный компонент. На его долю приходится 90% всего белка красных кровяных телец. Примечательно, что в собственном метаболизме эритроцита кислород не используется [7]. Молекулярная масса большинства изоформ этого пигмента колеблется в пределах 64,5–68 кД. Размер – 6,8 нм. рI – 6,8. Первичная структура характеризуется высоким содержанием гистидина [4, 8].

Все типы гемоглобина являются тетрамерами, построенными из пары α -субъединиц, и специфической для каждого типа иной пары. Каждый из четырех протомеров построен из двух неравных частей: небелковая структура – гем (4% массы молекулы Hb, обеспечивает окраску и ковалентную связь с кислородом) и белковая глобула – глобин (96% массы, чаще представлен либо 141 (α -цепь), либо 146 (β -, γ -, δ -цепи) аминокислотными остатками) [4, 8].

Комплекс, составленный из одной глобиновой субъединицы и одного гема, называется Сведберговой единицей. Таким образом, молекула Hb построена из четырех Сведберговских единиц, слабо связанных между собой нековалентными связями (гидрофобными, электростатическими, водородными) [8].

Синтез гема происходит в митохондриях. Глобин, как и любой белок, синтезируется на рибосомах. Их объединение в мультимер осуществляется в фазу созревания полихроматофильного нормобласта [9].

Лигандом молекулы гемоглобина, присоединяющим кислород, является ион Fe^{2+} . Это взаимодействие обратимо и зависит от парциального давления O_2 . В артериальной крови практически весь Hb (95–98%) связан с кислородом. В венозной крови содержание оксигемоглобина составляет 67–75%, остальная часть приходится на долю свободного (редуцированного) Hb [1, 4, 5].

Норма общего Hb в крови у мужчин составляет 135–170 г/л, у женщин – 120–150 г/л [10].

В крови у новорожденного содержится 140–190 г/л этого белка, но к концу первого месяца его уровень снижается до нормального для взрослого. Динамика средней концентрации Hb крови в период от рождения до 12 лет представлена в таблице [9].

В плане градации Hb выделяют:

- *нормальные* формы: восстановленный (редуцированный) Hb, оксигенированный Hb, карбгемоглобин и метгемоглобин.

- *производные*: карбоксигемоглобин, сульфгемоглобин, метгемоглобин, циангемоглобин и др.

- *типы (изоформы)* – принципиально различные подвиды Hb, кодирующиеся отдельными генами, различающиеся строением протомеров глобина. Очевидно, гемоглобины разных типов отличаются первичной, вторичной, третичной и четвертичной структурами [10].

К основным типам гемоглобина человека относятся следующие:

- HbA_1 – является преобладающим в крови взрослого (98% от общего Hb). Тетрамер, его молекула построена из двух α - и двух β -субъединиц (141 и 146 аминокислотных остатков соответственно). Его синтез начинается уже на 6–8 неделях гестации и продолжается до конца жизни [8, 11].

- HbA_2 (минорный, 2 α - и 2 δ -протомера). Его концентрация в крови взрослого 1,5–3,5% от общего Hb. Уровень этого изоформа возрастает при гипохромных и мегалобластных анемиях, серповидноклеточной анемии, β -талассемии. Снижение его концентрации в крови отмечается при δ -талассемии, гемоглобинопатии H, эритролейкозе [8, 9, 11].

- Примитивный (эмбриональный) Hb (HbP). Обладает более высокой (чем HbA_1) тропностью к O_2 . Является самым ранним гемоглобином эмбриона. Синтезируется в раннем эмбриогенезе (с 4 по 12 нед) в желточном мешке [8, 11].

- Плодовый (фетальный) гемоглобин (HbF , тетрамер, 2 α - и 2 γ -цепи). Его продукция начинается с 12-й недели внутриутробного развития, и к 6 месяцам полностью замещает HbP в крови. К моменту рождения концентрация HbF составляет 55–85% от общего. В крови взрослого человека его доля составляет 1,5% от общего Hb [8, 11].

α -, β -, γ - и δ -гены гемоглобина расположены на коротких плечах 11-й и 16-й хромосом [11, 12].

Средние уровни Hb в крови в раннем постнатальном периоде

Возраст	Первые 4 дня	1/2 мес	1 год	2 года	4 года	8 лет	12 лет
КонцHb	194 г/л	116 г/л	119 г/л	122 г/л	126 г/л	131 г/л	135 г/л

Известно около 200 патологических типов Hb, причиной возникновения которых являются мутации. Данные протеины регистрируются в крови человека при состояниях, называемых гемоглинопатиями (M Hyde Parc, Bristol, Sydney и др.) [13–15].

По причине стремительного прогресса биохимических методик индикации, в последние годы роль отдельных типов гемоглобина, как диагностических и прогностических маркеров, приобретает все большее прикладное значение.

Особо следует сказать о методологии количественного определения гемоглобинов. В большинстве стран в качестве общепринятых применяются колориметрические методы, рекомендованные комитетом по стандартизации Европейского и Международного общества по гематологии (1964), среди которых доминирующим является унифицированный гемоглобинцианидный метод. Оптические способы обнаружения гемоглобинов практичны, доступны и просты, но имеют существенный недостаток: они имеют низкую селективность, не позволяющую регистрировать отдельные типы гемоглобина [9, 10].

Существуют также методики лабораторного количественного анализа гемоглобинов путем электрофореза в агарозе, крахмальном геле, ацетате целлюлозы и др. Но они являются полуселективными, так как определяют только фракции гемоглобинов со сходной электрофоретической подвижностью, а не индивидуальные типы этого белка [10].

В последние десятилетия в медицинской практике наблюдается тенденция перехода от регистрации фракций веществ (общий белок, общий гемоглобин и др.) к определению отдельных форм вещества. Такой подход повышает качество диагностики и прогностической оценки. Очевидно, медицина XXI века нуждается в принципиально новых технологиях тестирования гемоглобинового профиля по каждому из основных его изоформ [16].

Наиболее адекватно отвечают вышеуказанным требованиям уже давно известные иммунохимические методы определения белков (ИФА, иммунофлюоресценция, иммуноблоттинг, методика Манчини и др.). Они до сих пор остаются максимально специфичными, точными, чувствительными и надежными [10, 16].

Попытки моделирования иммунохимических методов количественного анализа некоторых фракций гемоглобинового профиля предпринимались еще с начала прошлого столетия. В данных работах исследователи исходили из убеждения, что

разработка и внедрение в клиническую диагностику иммунохимических диагностических тест-систем на значимые типы гемоглобина целесообразно и актуально, так как значительно оптимизирует и облегчит лабораторную оценку статуса красной крови. В дальнейшем научный интерес в этом направлении был снижен вследствие внедрения в международную клиническую практику оптических циангемоглобиновых методов индикации. Но в последние десятилетия, в связи с усовершенствованием иммунохимических методик и ростом научного интереса к отдельным компонентам гемоглобинового спектра с одной стороны, ростом потребности в специфических диагностических тестах на конкретные типы этого протеина, с другой стороны, отмечается активизация работы немногочисленных научных групп по разработке и внедрению в медицинскую практику новых, современных иммунохимических тест-систем на различные генотипы гемоглобина человека [17–19].

Определение количества Hb в крови имеет большое клиническое значение. Снижение его концентрации отмечается при анемиях различной этиологии. Повышение Hb крови может быть как физиологическим, так и патологическим. Умеренные повышения встречаются при гемолитических анемиях, анемии Кули, гемоглобинозе С и др. Значительные увеличения встречаются при всех гемоглинуриях [4, 8, 20].

Существует множество нозологических форм, при которых имеет важное значение не только изменение количества общего гемоглобина крови, но и отдельных его типов, изменение соотношения которых в клинической практике используют для диагностики различных патологических состояний [8, 21–23].

Например, при снижении скорости синтеза α -цепей возникает α -талассемия. При возникновении мутаций в β -гене нарушается синтез β -полипептидной цепи, возникает β -талассемия, что приводит к образованию повышенных количеств HbF. Талассемии сопровождаются анемиями, которые могут принимать очень тяжелые формы. Увеличение количества HbF наблюдается также при гомозиготной форме β -талассемии, наследственном персистировании фетального гемоглобина, σ -, β -талассемии, серповидноклеточной анемии [1, 24].

Увеличение пропорции HbF при рождении наблюдается у недоношенных, у новорожденных, подвергавшихся хронической внутриматочной гипоксии, а также у новорожденных, родившихся у женщин с поздними гестозами (в частности – с не-

фропатией), гипертонической болезнью, эндокринными нарушениями, интоксикациями, сердечно-сосудистой патологией, гематологическими заболеваниями. Уменьшенные уровни HbF обнаружены у новорожденных с синдромом Дауна [25–27]. Повышение уровня плодового гемоглобина отмечается при преждевременной отслойке плаценты, угрозе прерывания беременности [18, 21]. Значительное снижение уровня этого белка регистрируется у больных с различными типами эритробластозов [2, 16]. Показано снижение концентрации HbF в крови пациентов с лимфогранулематозом, сфероцитарной гемолитической анемией, тромбоцитопенической пурпурой [20, 28].

Литературные данные последних лет, основанные именно на иммунохимических методах определения плодового и примитивного гемоглобинов, свидетельствуют, что значение селективной индикации этих протеинов как диагностических маркеров представляет значительно больший прикладной интерес, чем считалось ранее. Показан рост продукции HbF при хронических гипоксиях различного генеза [26, 29]. Сходный компенсаторно-адаптивный рост концентрации этого белка отмечается у людей, проживающих в условиях высокогорья [25]. Значительное повышение продукции плодового гемоглобина отмечено при тяжелых формах героиновой наркомании [30].

Следует отметить, что до применения иммунохимических методов индикации сведения о прикладном значении примитивного гемоглобина как клинико-диагностического маркера были крайне скудны. На наш взгляд, это объяснялось тем, что (как считалось прежде) продукция HbP полностью ингибирована как у детей, так и у взрослых, что не вызывало интереса к данному белку как диагностическому маркеру [4, 9]. Однако, как показали исследования последних лет, основанные на внедрении иммунохимических методик, статистически значимое повышение концентраций примитивного и плодового гемоглобинов в крови регистрируется при некоторых онкологических заболеваниях красной крови (эритремия, сублейкемический миелоз, острый и хронический лимфолейкоз), что свидетельствует о высоком диагностическом значении этих протеинов как канцероэмбриональных антигенов [17, 31]. Достоверный рост уровня HbF и появление в крови HbP наблюдается при тяжелых гипоксических состояниях новорожденных, сопровождающихся задержкой внутриутробного развития или гемолитической болезнью [29, 32].

Список литературы

1. Топунов А.Ф. Неизвестный гемоглобин / А.Ф. Топунов, О.В. Космачевская, К.Б. Шумаев // *Материалы Международной конференции «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии»*: Под редакцией Е.Л. Глориозова. – 2015. – С. 58–71.
2. Manca L. Disorder of synthesis of human fetal hemoglobin / L. Manca, B. Masala // *IUBMB Life*. – 2008. – V. 60. – P. 94–111.
3. Wolk M. Development of fetal haemoglobin-blood cells (F cells) within colorectal tumor tissues / M. Wolk, J.E. Martin, C. Reinus // *J. Clin. Pathol.* – 2006. – V. 59. – P. 598–602.
4. Заводник И.Б. Активация кислорода гемоглобином и электронтранспортной цепью митохондрий / И.Б. Заводник, И.К. Дремза, Е.А. Лапшина, В.Т. Чецевик, В.А. Аверин // *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. – 2009. – № 2 (26). – С. 58–60.
5. Артюхов В.Г. Гемоглобин человека в условиях воздействия различных физико-химических агентов / В.Г. Артюхов, О.В. Путинцева, Е.А. Калаева, В.С. Савостин. – Воронеж: Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2013. – 364 с.
6. Perutz M.F. *Molecular Anatomy, Physiology, and Pathology of Hemoglobin. Molecular Basis of Blood Diseases* / Ed.C. Stamatagayanopoulos. – Philadelphia: Saunders, 1987. – 421 p.
7. Alan N. Schechter. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine // *Molecular Medicine Branch Blood*. – 2008. – V. 112. – № 10. – P. 3927–3938.
8. Кузнецова Н.П. Ассоциация–диссоциация молекул гемоглобина и полимерного гемоглобина в растворах / Н.П. Кузнецова, Л.Р. Гудкин, Р.Н. Мишаева, Е.А. Березецкая, М.Э. Вылегжанина, Т.Е. Суханова, Е.Ф. Панарин // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2010. – Т. 46, № 2. – С. 237–242.
9. Даштаянц Г.А. *Клиническая гематология*. – Киев: «Здоровье», 1973. – 692 с.
10. Кузнецова Н.П. Ассоциация–диссоциация молекул гемоглобина и полимерного гемоглобина в растворах / Н.П. Кузнецова, Л.Р. Гудкин, Р.Н. Мишаева, Е.А. Березецкая, М.Э. Вылегжанина, Т.Е. Суханова, Е.Ф. Панарин // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2010. – Т. 46, № 2. – С. 237–242.
11. Сингер М. *Гены и геномы: В 2-х томах. Пер. с англ.* / М. Сингер, П. Берг. – М.: Мир, 1998. – 478 с.
12. Телепнева Л.Г. Гемоглобин и истоки генетического кода / Л.Г. Телепнева // *Conference and the III stage of the Championship in medicine, pharmaceuticals and veterinary sciences. (London, December 05 – December 10, 2012)*. – Chief editor – Pavlov V. V. – London, 2013. – С. 28–32.
13. Сергунова В.А. Гемоглобин: модификации, кристаллизация, полимеризация (обзор) / В.А. Сергунова, Е.А. Манченко, О.Е. Гудкова // *Общая реаниматология*. – 2016. – Т. 12, № 6. – С. 49–63.
14. Бойко О.В. Молекулярные механизмы бактерионосительства (Характеристика и подробный анализ) / О.В. Бойко, А.А. Терентьев, В.И. Бойко. – Palmarium academic publishing, Saarbrücken, Germany, 2012. – 175 с.
15. Волосников Д.К. Аномалии структуры и особенности синтеза гемоглобина в онтогенезе: современное состояние проблемы / Д.К. Волосников, Е.Н. Серебрякова // *Гематология и трансфузиология*. – 2010. – Т. 55, № 1. – С. 36–40.
16. Турна А.А. Проблема определения гемоглобина в лабораторной диагностике и методы ее решения / А.А. Турна // *Поликлиника*. – 2013. – № 3. – С. 48–53.
17. Кривенцев Ю.А. Новый способ клинической оценки гемоглобинового спектра / Ю.А. Кривенцев, Р.А. Бисалиева, Л.М. Ишмемедова, А.И. Носков, М.В. Рамазанов // *Сибирский медицинский журнал*. – 2011. – Т. 102, № 3. – С. 52–54.

18. Бриллиант С.А. Гетерогенность белковых фракций гемоглобина костного мозга и системы крови при экстремальных воздействиях на организм / С.А. Бриллиант, Б.Г. Юшков // Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19, № 5. – С. 20.
19. Мордвинова Е.В. Новый подход к диагностике уровня гемоглобина в крови / Е.В. Мордвинова, Н.С. Козлова // Материалы конференции «Научные достижения молодых ученых XXI века в рамках приоритетных направлений стратегии научно-технологического развития страны». – СамГМУ. – 2017. – С. 239–240.
20. Барановская И.Б. Гемоглобин ретикулоцитов в дифференциальной диагностике анемий / И.Б. Барановская, С.А. Онищук // Вестн. Оренбургского гос. университета. – 2008. – № 5. – С. 31–34.
21. Андриевская И.А. Структурно-функциональное состояние гемоглобина у рожениц при герпесной инфекции во время беременности / И.А. Андриевская, М.Т. Луценко // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2011. – Выпуск 39. – С. 17–19.
22. Коханов А.В. Разработка тест-системы для количественного определения плацентарной щелочной фосфатазы / А.В. Коханов, О.В. Мусатов, А.А. Мяснянкин, Р.И. Асфандияров, И.С. Ямпольская // Астраханский медицинский журнал. – 2011. – Т. 6, № 3. – С. 229–230.
23. Lee M.H. Associations between Enhanced Fetal Hemoglobin Levels and Ineffective Reticulocyte Production in Diabetics / M.H. Lee, J.H. Kim, M.W. Im // Acta Haematol. – 2009. – V.122, № 4. – P. 247–251.
24. Сметанина, Н.С. Соотношение генотипа и особенностей клинических проявлений β -талассемии / Н.С. Сметанина, Е.Г. Казанец, Ю.Н. Токарев // Гематология и трансфузиология. – 2001. – Т. 46, № 1. – С. 31–34.
25. Шамратова В.Г. Фетальный гемоглобин – маркер кислородного дефицита клеток при гиподинамии / В.Г. Шамратова, Е.Е. Исаева, С.Р. Усманова // Вестник Башкирского университета. – 2015. – Т. 20, № 1. – С. 101–105.
26. Шамратова В.Г. Роль фетального гемоглобина в адаптации к гипоксическому состоянию при ограниченной двигательной активности / В.Г. Шамратова, С.Р. Усманова, Е.Е. Исаева // Биотехнология – от науки к практике: Материалы всерос. конф. – Уфа: РИЦ БашГУ, 2014. – Т. 2. – С. 81–85.
27. Бойко О.В. Влияние астраханского газоперерабатывающего завода на загрязнение воздуха производственных помещений и территории / О.В. Бойко, В.И. Бойко, Н.И. Гудинская // Гигиена и санитария. – 2016. – Т. 95, № 2. – С. 167–171.
28. Мусатов О.В. Активность щелочной фосфатазы сыворотки крови в зависимости от вида операции при ранах печени, селезенки и почки в эксперименте / О.В. Мусатов, С.А. Зурнаджан, А.В. Коханов // Астраханский медицинский журнал. – 2017. – Т. 18, № 2. – С. 63–69.
29. Кривенцев Ю.А. Иммунохимический анализ концентрации фетального гемоглобина в крови новорожденных мальчиков и девочек с внутриутробной гипоксией / Ю.А. Кривенцев, Д.М. Никулина, Р.А. Бисалиева // Омский научный вестник. – 2006. – Т. 46, № 9. – С. 272–274.
30. Бисалиева Р.А. Иммунохимический анализ фетального гемоглобина в крови наркологических больных / Р.А. Бисалиева, Ю.А. Кривенцев, Р.В. Бисалиев, В.С. Кальной // Наркология. – 2009. – Т. 8, № 1. – С. 95–97.
31. Безрукавникова Н.В. Стероидсвязывающие белки у больных раком молочной железы / Н.В. Безрукавникова, А.В. Коханов, Ю.А. Кривенцев, Д.М. Никулина, Л.М. Берштейн, В.В. Кутуков // Вопросы онкологии. – 2007. – Т. 53, № 4. – С. 409–413.
32. Бахмутова Л.А. Выявление эмбрионального гемоглобина в крови новорожденных с внутриутробной гипоксией / Л.А. Бахмутова, Ю.А. Кривенцев, Л.А. Огуль // Вопросы практической педиатрии. – 2006. – Т. 1, № 4. – С. 12.