

Chương 4

HÓA HỌC HEMOGLOBIN

MỤC TIÊU

1. Mô tả được cấu tạo hóa học và nêu được cách phân loại, tính chất của porphyrin.
2. Mô tả được cấu trúc hóa học của hem và globin.
3. Trình bày, giải thích được sự kết hợp giữa hem và globin.
5. Nêu được tính chất hóa học và các vai trò sinh lý quan trọng của hemoglobin trong cơ thể.

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1 Cromoprotein

Cromoprotein là một loại protein phức tạp có nhóm ngoại là chất màu. Cromoprotein được chia thành hai loại:

- Cromoprotein với nhóm ngoại không chứa nhân porphyrin.

Ví dụ:

+ Flavoprotein: nhóm ngoại chứa riboflavin.

+ Feritin: nhóm ngoại chứa Fe.

+ Hemocyanin: nhóm ngoại chứa Cu.

- Cromoprotein với nhóm ngoại chứa nhân porphyrin (porphyrinoprotein).

Ví dụ:

+ Hemoglobin: sắc tố đỏ của hồng cầu.

+ Myoglobin: sắc tố hô hấp chứa trong tế bào cơ của động vật.

+ Chlorophyll: diệp lục tố trong thực vật, đóng vai trò quan trọng trong sự quang hợp.

+ Cytochrome: enzym vận chuyển điện tử trong phản ứng oxy hóa khử của chuỗi hô hấp tế bào.

+ Catalase: Enzym tham gia các phản ứng oxy hóa khử sinh học.

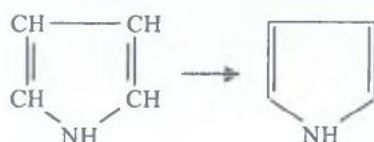
1.2. Porphyrin

1.2.1. Cấu tạo hóa học

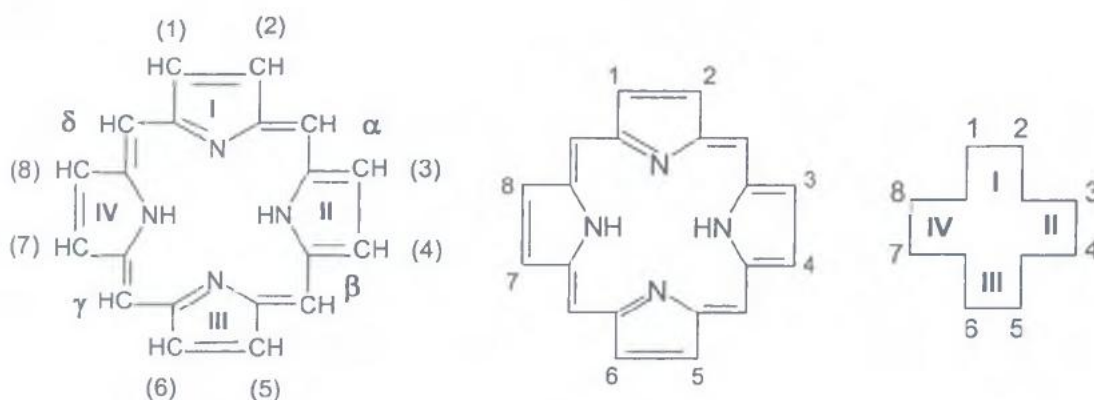
Porphyrin có nhân cơ bản là porphin, cấu tạo bởi 4 vòng pyrol (dị vòng 5 cạnh) liên kết với nhau qua 4 cầu nối methylen ($-\text{CH}=\text{}$).

Trong phân tử porphin:

- Các vòng pyrol được đánh số I, II, III và IV theo chiều kim đồng hồ.
- Các cầu methylen được ký hiệu α , β , γ , δ .
- Vị trí của các nhóm thế trên khung phân tử được đánh số 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 và 8.



Hình 4.1. Cấu trúc của vòng pyrol



Porphin

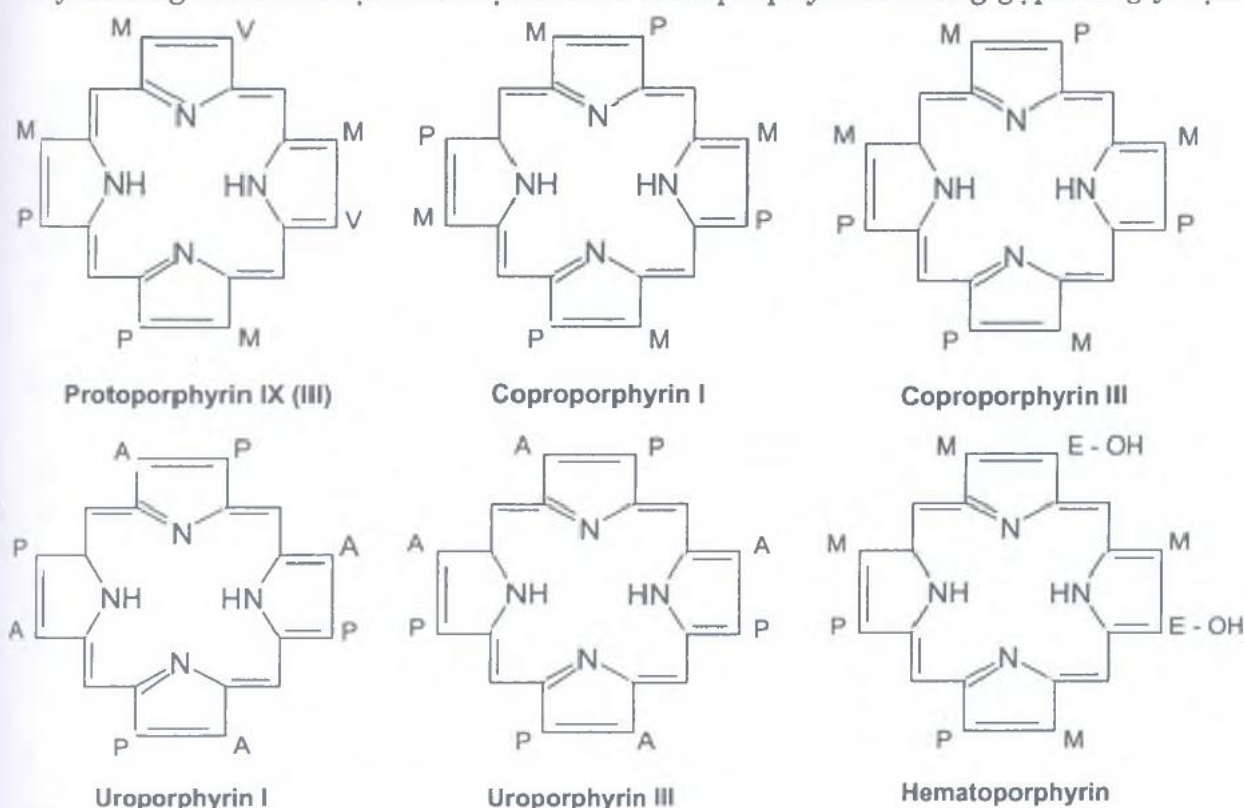
Hình 4.2. Cấu trúc của nhân porphin

Porphyrin là nhân porphin được gắn thêm một số nhóm thế.

Bảng 4.1. Các nhóm thế của porphyrin

Tên gốc	Công thức	Ký hiệu
Methyl	$-\text{CH}_3$	$-\text{M}$
Ethyl	$-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	$-\text{E}$
Hydroxyetyl	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$	$-\text{E}-\text{OH}$
Vinyl	$-\text{CH}=\text{CH}_2$	$-\text{V}$
Acetyl	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$-\text{A}$
Propionyl	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$-\text{P}$

Có nhiều loại porphyrin khác nhau tùy loại và vị trí của nhóm thế; sau đây là công thức cấu tạo của một số dẫn xuất porphyrin thường gặp trong y học:



Hình 4.3. Cấu trúc của một số hợp chất porphyrin sinh học

1.2.2. Tính chất

- Có màu, có phổ hấp thụ đặc trưng ở vùng tử ngoại hay khả kiến (do có hệ thống nối đôi liên hợp).
- Độ tan phụ thuộc số lượng nhóm carboxyl thế. Ví dụ:
 - + Uroporphyrin có 8 nhóm carboxyl nên tan rất tốt trong nước.
 - + Protoporphyrin chỉ có 2 nhóm carboxyl nên ít tan trong nước, tan nhiều trong lipid.
- Dễ tạo phức với ion kim loại (nhờ hai nguyên tử H gắn với hai nguyên tử N thuộc nhân pyrol II và IV rất linh động và dễ bị thay thế bởi các ion kim loại có hóa trị 2), do đó protein nhóm này còn được gọi là metaloprotein.
 - Thí dụ:
 - + Trong hemoglobin, myoglobin, cytocrom, catalase: porphyrin kết hợp với Fe^{2+} .
 - + Trong clorophyl: porphyrin kết hợp với Mg^{2+} .
- Có tính kiềm yếu (do nguyên tử N trong các nhân pyrol) đồng thời cũng có tính acid (do có nhóm $-\text{COOH}$ ở mạch nhánh). Điểm đẳng điện khoảng 3–4,5.

2. HEMOGLOBIN (HB)

Hemoglobin ký hiệu là Hb, còn gọi huyết sắc tố hay huyết cầu tố, có màu đỏ, là một cromoprotein thuộc nhóm porphyrinoprotein, hiện diện trong hồng cầu của các động vật cao cấp, đóng nhiều vai trò sinh lý quan trọng trong cơ thể.

Hemoglobin kết tinh dưới dạng những tinh thể khác nhau tùy theo mỗi loài động vật.

Hb có trọng lượng phân tử $M \approx 64.500$, tỷ lệ sắt trong Hb là 0,34%.

Hồng cầu người chứa khoảng 32% hemoglobin, tương ứng với 15g trong 100 ml máu.

2.1. Cấu tạo hóa học

Hemoglobin gồm có hai phần:

- Nhóm ngoại: hem.
- Protein thuần: globin

2.1.1. Hem

Hem là hợp chất gồm có nhân protoporphyrin IX gắn với sắt hóa trị II (Fe^{2+}).

Fe^{2+} nằm ở trung tâm nối với 4 nguyên tử N của bốn vòng pyrol qua 4 liên kết phối trí nằm trên mặt phẳng của vòng porphyrin.

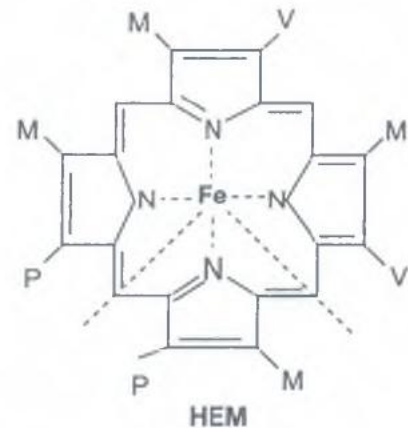
Fe^{2+} còn 2 liên kết phối trí nằm ở vị trí thẳng góc với mặt phẳng phân tử, mỗi liên kết ở về một phía. Các liên kết này có thể kết hợp với chuỗi polypeptid của globin và một số chất khác (O_2 , CO).

Hem bị oxy hóa thành hematin, khi đó Fe^{2+} biến thành Fe^{3+} . Hematin có thể được tách riêng dưới dạng muối clorhydrat, kết tinh dưới dạng các tinh thể đặc biệt gọi là tinh thể hemin hay Teichman (được ứng dụng trong pháp y để xác định các vết máu).

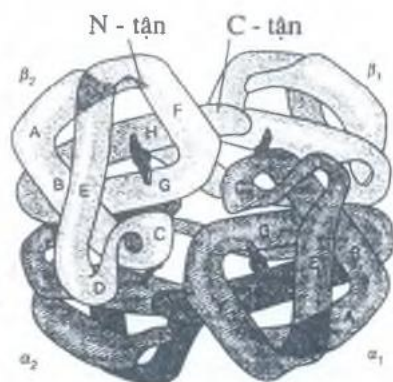
2.1.2. Globin

Ở người trưởng thành, globin của Hb A gồm 4 chuỗi polypeptid có cấu trúc bậc I đã được xác định:

- Hai chuỗi α mỗi chuỗi có 141 acid amin.
- Hai chuỗi β , mỗi chuỗi có 146 acid amin.



Hình 4.4. Cấu trúc hóa học của hem



Hình 4.5. Các chuỗi polypeptid của globin

Các chuỗi này gắn với nhau bằng tương tác không cộng hóa trị tạo thành hai dimer $(\alpha\beta)_1$ và $(\alpha\beta)_2$

Trong cấu trúc bậc II, 80% acid amin của các chuỗi α và β tạo nên 7 đoạn xoắn α helix (chuỗi α) hay 8 đoạn xoắn α helix (chuỗi β). Mỗi đoạn xoắn có chiều dài từ 7 đến 20 acid amin, được ký hiệu A, B, C... theo thứ tự (đoạn xoắn α đầu tiên là A, đoạn xoắn α thứ hai là B... và đoạn xoắn α thứ 8 là H). Những đoạn acid amin còn lại không xoắn, nằm giữa nối các đoạn xoắn, được ký hiệu bởi hai mẫu tự của hai đoạn xoắn ở hai bên. (Ví dụ: ở giữa đoạn xoắn A và đoạn xoắn B là đoạn AB không xoắn)

Trong cấu trúc bậc III, các chuỗi α và β cuộn khúc tại các đoạn acid amin không xoắn.

Mỗi chuỗi polypeptid xoắn và cuộn khúc kết hợp với một hem tạo thành một bán đơn vị của Hb. Bốn bán đơn vị này kết hợp với nhau tạo thành một phân tử Hb có cấu trúc bậc bốn (tetramer).

Về mặt không gian, chuỗi globin cuộn lại tạo thành một khe kỵ nước chứa hem. Các hem bị vùi sâu trong vùng kỵ nước của các chuỗi polypeptid. Các chuỗi này tương tác với nhau và liên kết với hem bằng liên kết ion, liên kết hydro và lực Van der Waals.

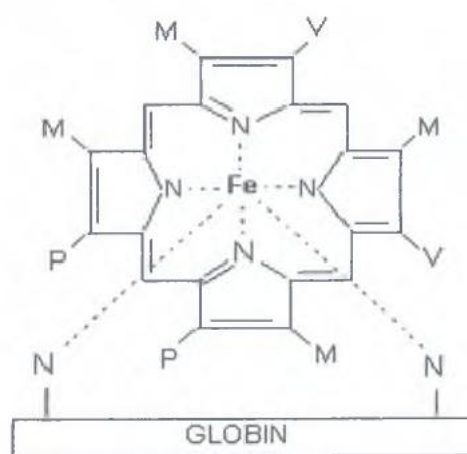
2.1.3. Sự kết hợp giữa hem và globin để tạo thành hemoglobin

Mỗi chuỗi polypeptid của globin kết hợp với một hem qua liên kết phối trí giữa Fe^{2+} của hem với nitơ (N) trong nhân imidazol của acid amin histidin ở đoạn xoắn α -helix F (His F8) và đoạn xoắn α -helix E (His E7) của mỗi chuỗi globin; tạo thành một bán đơn vị của phân tử Hb.

His F8 còn gọi là his gần, kết hợp trực tiếp với Fe của hem, his E7 còn gọi là his xa vì không kết hợp trực tiếp với Fe của hem, và khoảng cách từ his E7 đến Fe^{2+} xa hơn so với his F8.

Hai liên kết này ở về hai phía của mặt phẳng protoporphyrin.

Vậy một phân tử Hb có cấu trúc bậc 4 gồm bốn bán đơn vị (tetramer) kết hợp với nhau bằng các liên kết không cộng hóa trị, mỗi bán đơn vị là một chuỗi polypeptid kết hợp với một hem. Một phân tử globin sẽ kết hợp với bốn hem.



Hình 4.6. Sơ đồ sự kết hợp giữa hem và globin

2.2. Các loại hemoglobin

Đặc tính chung loại của hemoglobin là do phần globin quyết định.

Các globin khác nhau do thành phần và thứ tự sắp xếp của các acid amin khác nhau.

Ngày nay, với kỹ thuật phân tích hiện đại, người ta đã xác định được cấu tạo của globin thuộc các hemoglobin bình thường hay bệnh lý.



Hình 4.7. Cấu trúc bậc 4 của phân tử hemoglobin.

2.2.1. Hemoglobin bình thường.

- Hb G (Gower) ($\zeta_2 \xi_2$): có ở phôi thai.
- Hb P (Portland) ($\zeta_2 \gamma_2$): có ở phôi thai.
- Hb F (Fetal) ($\alpha_2 \gamma_2$): có ở bào thai và trẻ sơ sinh, sẽ dần dần được thay thế bởi HbA.
- Hb A (Addult) ($\alpha_2 \beta_2$): có chủ yếu ở người trưởng thành.
- Hb A₂ ($\alpha_2 \delta_2$): chỉ chiếm 2,5% tổng số Hb ở người trưởng thành.

Các loại này chỉ khác nhau về thành phần acid amin ở đoạn xoắn F của globin.

Bảng 4.2. Sự khác nhau về thành phần acid amin của HbA, HbA₂, HbF tại các đoạn xoắn

Chuỗi polypeptid/Hb	Acid amin tại các đoạn xoắn								
	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈	F ₉
HbA (β)	Phe	<u>Ala</u>	<u>Thr</u>	Leu	Ser	Glu	Leu	His	Cys
HbA ₂ (δ)	Phe	<u>Ser</u>	<u>Gln</u>	Leu	Ser	Glu	Leu	His	Cys
HbF (γ)	Phe	<u>Ala</u>	<u>Gln</u>	Leu	Ser	Glu	Leu	His	Cys

2.2.2. Hemoglobin bất thường (Hb bệnh lý)

Nguyên nhân là do sự thay đổi thành phần và thứ tự sắp xếp của các acid amin trong phân tử globin làm thay đổi độ tan và độ bền vững của Hb, ảnh hưởng đến ái lực của Hb đối với oxy cũng như sự vận chuyển oxy đến các tổ chức.

Các hemoglobin bất thường này là nguyên nhân gây ra một số bệnh lý gọi là bệnh di truyền hay bệnh phân tử.

Ví dụ:

- HbS ($\alpha_2^A \beta_2^S$):
+ Glutamat ở vị trí 6 của chuỗi β được thay bằng *valin*, hồng cầu có dạng lưỡi liềm.

- + Gây bệnh HbS (Drepanocytose), có nhiều biểu hiện rối loạn trên lâm sàng như thiếu máu huyết giải mãn tính, đau kéo dài, đột quỵ, nghẽn mạch, hội chứng ngực cấp, suy thận, dễ bị nhiễm trùng.
- + Có thể được chẩn đoán bằng phương pháp điện di huyết thanh ở môi trường kiềm: HbS di chuyển về anod chậm hơn so với HbA.



Hình 4.8. Hồng cầu hình lưỡi liềm (HbS)

- HbC ($\alpha_2^A\beta_2^C$):
 - + Glutamat ở vị trí 6 của chuỗi β được thay bằng *lysin*, gây thiếu máu huyết giải nhẹ.
 - + HbC có thể kết tinh trong tế bào hồng cầu.
 - + Khi điện di, HbC di chuyển về anod chậm hơn so với HbA và HbS.
- HbM:
 - + Là hiện tượng tạo methemoglobin máu không chữa được bằng thuốc do Fe luôn ở trạng thái Fe^{3+} .
 - + Nguyên nhân là sự khiếm khuyết do di truyền như vài đột biến trong chuỗi α hay β -globulin, thúc đẩy sự tạo thành methemoglobin. Ngoài ra, còn có thể do sự thiếu enzym NADH cytochrom b5 reductase để biến đổi metHb (Fe^{3+}) thành Hb (Fe^{2+}).
- Thalassemia: là bệnh thiếu máu huyết giải do di truyền xảy ra vì có sự mất cân bằng trong tổng hợp các chuỗi polypeptid của globin.
 - + Bệnh α -thalassemia: do có sự bất thường trong tổng hợp chuỗi polypeptid α tạo Hb Bart (γ_4) và Hb H (β_4) gây ra bệnh thiếu máu hồng cầu nhỏ nhược sắc huyết giải, giảm khả năng phân phối oxy đến mô.
 - + Bệnh β -thalassemia: do có những đột biến trong tổng hợp chuỗi β , nên chuỗi α không thể tạo thành dạng tetramer bền vững, sẽ kết tủa gây bệnh thiếu máu huyết giải nghiêm trọng trong hai năm đầu sau khi sinh, và thường bị tử vong trong khoảng từ 15-25 tuổi.



Hình 4.9. Hồng cầu trong bệnh thalassemia

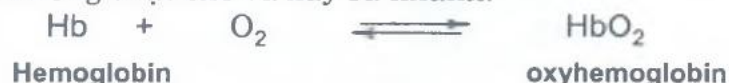
2.3. Tính chất của hemoglobin

2.3.1. Kết hợp với Oxy

2.3.1.1. Cơ chế kết hợp

Hb kết hợp thuận nghịch với phân tử oxy tạo ra oxyhemoglobin (HbO_2).

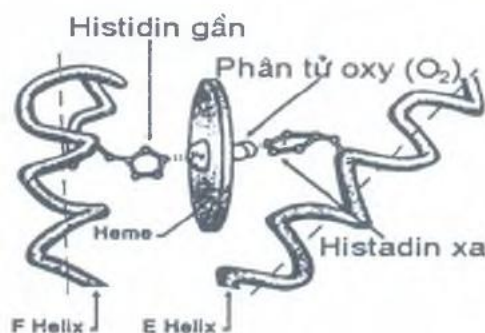
Sự kết hợp này không chặt chẽ và xảy ra nhanh:



Đây chỉ là phản ứng gắn oxy chứ không phải phản ứng oxy hóa vì ion sắt vẫn còn hóa trị 2.

Khi Hb kết hợp với oxy, liên kết phối trí giữa His E7 và Fe^{2+} bị cắt đứt, một phân tử oxy sẽ thế chỗ His E7 để gắn với Fe^{2+} .

Một nguyên tử Fe của hem gắn với một phân tử O_2 , nên một phân tử Hb gắn được bốn phân tử O_2 và 1g Hb gắn được 1,39ml O_2 .

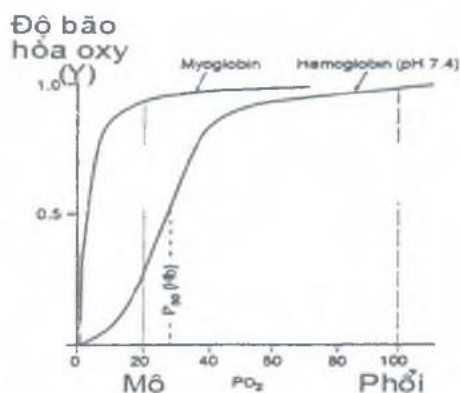


Hình 4.10. Cơ chế sự kết hợp giữa oxy và hemoglobin

2.3.1.2. Đường cong bão hòa oxy

Mối tương quan giữa áp suất riêng phần của oxy (PO_2) và độ bão hòa oxy của Hb được biểu thị bằng đường cong bão hòa oxy có dạng sigma (σ), khác với dạng hyperbol của myoglobin.

Đường cong có dạng sigma (σ) cho phép giải thích được khả năng kết hợp và giải phóng oxy rất hữu hiệu của hemoglobin dựa vào sự chênh lệch cao về PO_2 ở phổi và mô.



Hình 4.11. Đường cong bão hòa oxy của myoglobin và hemoglobin

2.3.1.3 Cấu hình deoxyhemoglobin và oxyhemoglobin

Hb có cấu hình thay đổi tùy thuộc vào trạng thái có gắn với oxy hay không.

- Cấu hình không gắn oxy (deoxyhemoglobin) là dạng “căng” hay trạng thái T (tense), có ái lực yếu đối với oxy. Ở trạng thái này, hai dimer $\alpha\beta$ tương tác với nhau qua một hệ thống liên kết hydro và liên kết ion, hạn chế sự di chuyển của các chuỗi polypeptid. Ngoài ra, sự hình thành các cầu muối giữa các chuỗi polypeptid giúp cho trạng thái T của deoxyhemoglobin được bền vững.

- Cấu hình gắn với oxy (oxyhemoglobin) là dạng “dãn” hay trạng thái R (relax), có ái lực mạnh đối với oxy. Ở trạng thái này, các liên kết hydro và liên kết ion giữa các dimer bị cắt đứt, các cầu muối bị phá vỡ nên các chuỗi polypeptid di chuyển tự do hơn.

Như vậy khi Hb kết hợp với oxy, có sự dịch chuyển từ trạng thái T sang trạng thái R.

2.3.1.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự kết hợp giữa Hb và oxy

Sự kết hợp thuận nghịch giữa Hb với oxy chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố:

- **Sự tương tác hem-hem:**

Đường cong kết hợp với oxy có dạng sigma (σ) do các bán đơn vị có tác động phối hợp cộng lực trong sự kết hợp với oxy. Điều này có nghĩa là sự kết hợp của một phân tử oxy với một hem đầu tiên sẽ làm gia tăng ái lực với oxy của các hem còn lại trong cùng phân tử hemoglobin (ái lực của Hb với phân tử oxy cuối cùng tăng gấp 300 lần so với oxy đầu tiên).

Tác động này gọi là sự tương tác hem-hem.

- **Phân áp của O_2 (pO_2):**

Ở phổi, nhờ pO_2 cao (khoảng 100mmHg), phản ứng xảy ra theo chiều thuận tạo thành HbO_2 , Hb bão hòa oxy (khoảng 97%–98%) theo dòng máu đến các mô.

Ngược lại, ở các mô do pO_2 thấp (khoảng 30mmHg), phản ứng xảy ra theo chiều nghịch, HbO_2 bị phân ly nhả O_2 để cung cấp cho các mô sử dụng trong quá trình chuyển hóa.

Do đó, Hb đóng vai trò sinh lý quan trọng là vận chuyển oxy từ phổi đến các tổ chức.

Máu người hàng ngày phải mang khoảng 600 lít oxy từ phổi đến các tổ chức, chủ yếu là nhờ hemoglobin của hồng cầu.

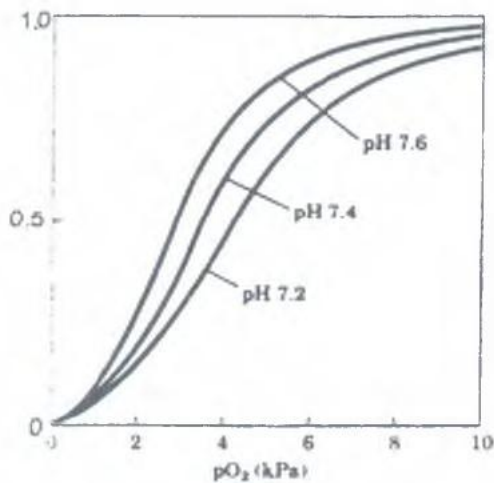
- **Sự thay đổi của pH – Hiệu ứng Bohr:**

Ở mô, sự giải phóng oxy từ hemoglobin tăng khi pH của máu giảm hay khi phân áp CO_2 (pCO_2) tăng, do ái lực của Hb với oxy bị giảm. Đường cong bão hòa oxy của Hb sẽ dịch chuyển sang bên phải.

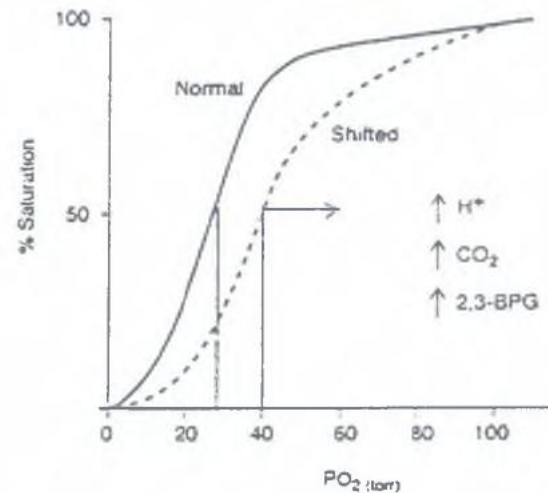
Ngược lại ở phổi, khí CO_2 được đào thải và pH của máu tăng, ái lực của Hb với oxy tăng sẽ đẩy mạnh sự kết hợp và vận chuyển oxy đến mô; đường cong bão hòa oxy của Hb sẽ dịch chuyển sang bên trái.

Ảnh hưởng của pH và nồng độ CO_2 đến khả năng kết hợp và giải phóng oxy của Hb được gọi là hiệu ứng Bohr.

% bão hòa oxy



% bão hòa oxy



Hình 4.12. Ảnh hưởng của pH và nồng độ CO_2 đến đường cong bão hòa oxy của Hb

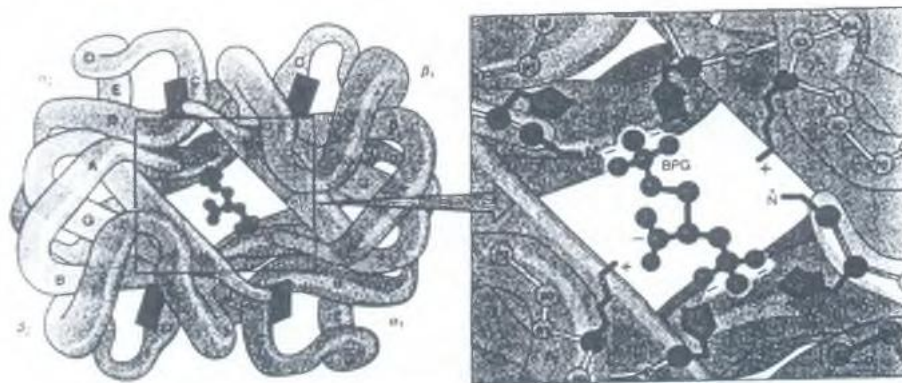
• Chất điều hòa 2,3 – Biphosphoglycerat (2,3 – BPG)

2,3 – BPG có nhiều trong hồng cầu, có khả năng kết hợp với Hb bằng các liên kết muối. Chất này làm giảm ái lực của Hb đối với oxy do có khả năng kết hợp và làm bền vững cấu hình T của phân tử deoxyhemoglobin, kích thích giải phóng O_2 ở các tổ chức:



Vị trí kết hợp là tại khe hở được tạo thành giữa hai chuỗi β , nằm ở vị trí trung tâm của phân tử deoxyhemoglobin. Các acid amin của chuỗi mang điện tích dương tạo liên kết ion với nhóm phosphat mang điện tích âm của 2,3-BPG. Một phân tử Hb kết hợp với một phân tử BPG.

HbF kết hợp yếu với 2,3-BPG nên có ái lực với oxy mạnh hơn nhiều so với HbA.



Hình 4.13. Sự kết hợp của 2,3 - Biphosphoglycerat (2,3 -BPG) với hemoglobin