

**УДК 577.121: 547.963**

*А. А. Гидулянов, С. В. Коношенко*

## **ЗАВИСИМОСТЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ ГЕМОГЛОБИНОВ ОТДЕЛЬНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ КЛАССА МЛЕКОПИТАЮЩИХ ОТ ХАРАКТЕРА ИХ ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ**

Изучение взаимодействия активных форм кислорода на биологические системы привлекает внимание исследователей на протяжении многих лет и по-прежнему не теряет своей актуальности.

В настоящее время накоплены многочисленные данные, касающиеся изучения механизмов перекисного окисления липидов, его роли в нормальном функционировании клеток и в патогенезе различных заболеваний [1,2,3].

Однако активные формы кислорода могут вызывать окислительную деструкцию не только липидов, но и белковых молекул. Этот процесс рассматривается как одна из возможных причин инактивации ферментов, изменения конформации белков при состоянии окислительного стресса [4]. Представляется важным выяснить зависимость окислительной модификации белков от их структурной организации. Решение этих вопросов в филогенетическом аспекте позволит лучше понять влияние реакций перекисидации на структурно-функциональный статус отдельных молекулярных систем, в том числе системы гемоглобина.

В связи с этим, целью настоящей работы явилось сравнительное изучение окислительной модификации главных фракций гемоглобина отдельных представителей млекопитающих в зависимости от внутримолекулярной структуры белковых молекул.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Материалом для исследования служили главные фракции гемоглобинов трех представителей класса млекопитающих- человека (*Homo sapiens*), быка (*Bos taurus*) и свиньи (*Sus scrofa*). В каждой видовой группе было не менее 25 особей. Гемоглобин выделяли по методу Драбкина [5]. Выделение фракций гемоглобинов и проверку их гомогенности осуществляли методами препаративного и аналитического электрофореза в 7% полиакриламидном геле [6,7]. Внутримолекулярную структуру гемоглобинов изучали, определяя общий объем гидрофобных полостей и уровень гидрофобности центральных участков белковых молекул. Внутримолекулярную гидрофобность гемоглобинов оценивали по степени флуоресценции зонда N-фенилнафтиламина (ФНА) в растворе белка на спектрофлуориметре Shimadzu PR [8]. Соотношение зонда и белка составляло 1:68. Длина волны возбуждения-300нм, длина волны регистрации- 436 нм. Общий объем

**ЗАВИСИМОСТЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ ГЕМОГЛОБИНОВ  
ОТДЕЛЬНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ КЛАССА МЛЕКОПИТАЮЩИХ  
ОТ ХАРАКТЕРА ИХ ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ**

гидрофобных полостей в гемоглобинах определяли методом солюбилизации углеводорода (бензола), используя рефрактометр ИРФ-23 [9]. Изучение окислительной модификации фракций гемоглобинов проводили на основе метода, описанного в литературе [10].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты исследований (табл.1), интенсивность флуоресценции зонда ФНА в главных фракциях гемоглобина человека и быка является практически одинаковой и характеризуется величинами  $28,6 \pm 0,72$  усл.ед. и  $27,83 \pm 1,45$  усл.ед., соответственно.

Таблица 1.  
Интенсивность флуоресценции (F) и солюбилизация бензола главными фракциями гемоглобинов отдельных представителей млекопитающих ( $M \pm m$ )

Объект исследования	F, усл.ед.	Степень связывания бензола белком (N; моль/моль)	Общий объем гидрофобных полостей ( $V; A^3$ )
Человек	$28,60 \pm 0,69$	$433 \pm 15$	$63400 \pm 3630$
Бык	$27,83 \pm 1,50$	$522 \pm 20$	$76389 \pm 3840$
Свинья	$36,54 \pm 0,10$	$346 \pm 11$	$50562 \pm 3300$

Максимальное значение интенсивности флуоресценции зонда, достоверно отличающееся от предыдущих, отмечено для главной фракции гемоглобина свиньи, что свидетельствует о более высоком уровне гидрофобности центральных участков белковых молекул.

Плотность упаковки молекул гемоглобина оценивали по объему гидрофобных полостей, используя метод солюбилизации бензола белком. Оказалось, что величина связывания бензола главными фракциями гемоглобинов млекопитающих различна и составляет от 346 до 433 молей углеводорода на одну молекулу белка (табл.1). Наиболее высокие значения общего объема гидрофобных полостей показаны для главных фракций гемоглобина человека и быка, а наименьшее значение - для гемоглобина свиньи.

Из этих данных следует, что главная фракция гемоглобина свиньи характеризуется большей плотностью упаковки белковых молекул по сравнению с аналогичными фракциями гемоглобинов человека и быка. Прослеживается обратная связь уровня гидрофобности зон сорбции ФНА и общего объема гидрофобных полостей: с повышением гидрофобности центральных участков белковых молекул возрастает плотность их упаковки.

При изучении окислительной модификации гемоглобинов в эритроцитах были получены данные, представленные в "Таблице 2".

Наиболее высокое содержание альдегидов и кетонов нейтральной природы (370 нм) отмечено для главных фракций гемоглобинов человека и быка. Фракция гемоглобина свиньи отличалась сравнительно высоким уровнем устойчивости к окислительной модификации. Проявляется выраженная взаимосвязь ( $r=+0,9$ ) показателя окислительной модификации и общего объема гидрофобных полостей.

Таблица 2.  
Содержание продуктов окислительной модификации нейтральной природы в главных фракциях изучаемых гемоглобинов ( $M \pm m$ )

Объект исследования	Продукты окислительной модификации (ед.опт.плотности, 370нм)
Человек	0,305±0,0032
Бык	0,358±0,0028
Свинья	0,200±0,0050

Из этих данных следует, что процессы окислительной модификации гемоглобина в эритроцитах в определенной мере зависят от структурной организации гемопротеида. Очевидно, что более компактные белковые молекулы в меньшей степени атакуются активными формами кислорода. Можно предположить, что осуществляемая в организме окислительная деструкция белковых молекул является одним из механизмов обновления их старых популяций по аналогии с физиологически значимым способом модификации и обновления фосфолипидного бислоя клеточных мембран с участием реакций перекисного окисления липидов.

### Список литературы

1. Бурлакова Е.В., Храпова Н.Г. Перекисное окисление липидов мембран //Успехи химии. -- 1985. -- Т. 54, №9. -- С.1540 – 1580.
2. Владимиров Ю.А., Оленев В.И., Сулова Т.Б. и др. Механизм перекисного окисления липидов и его действие на мембраны. Итоги науки и техники //Биофизика. – 1975. – №5. – С.56 – 117.
3. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К. Окислительный стресс при воспалении //Успехи современной биологии. – 1997. – Т.117. – В.2. – С.155 – 169.
4. Пескин А.В. Взаимодействие активного кислорода с ДНК //Биохимия. –1997. –Т.62. – В.12. – С.1571 – 1578.
5. Drabkin D. A simplified technique for large scale cristallisation of myoglobin and hemoglobin in the crystalline //Arch.Biochem. – 1949. – V.21. – P. 224 –226.
6. Ажицкий Г.Ю., Багдасарян С.Н. Возможность выделения мономерного иммунохимически чистого сывороточного альбумина //Лаб.дело. –1975. – №12. –С.712 –714.
7. Davis B. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins //Ann.N.Y.Acad.Sci. – 1964. – V.121. – №11. – P.404–407.
8. Остоловский Е.М., Боцянский А.Д., Задорожный Б.А. Исследование структуры сывороточного альбумина млекопитающих методом флуоресцентных зондов // Биофизика. – 1988. – Т.33. – №2. – С.350–358.
9. Измайлова В.Н., Ребиндер П.А. Структурообразование в белковых системах. – М.:Наука, 1974. – 392 с.
10. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения //Вопросы медицинской химии. – 1995. – Т.41. – В. 1. – С. 24–26.

Поступила в редакцию 10.02.2002 г.