

УКРАЇНСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК  
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ І БІОХІМІЇ ТВАРИН

На правах рукопису

**КОНОШЕНКО**  
Світлана Володимирівна

УДК 547.963.4:577

**ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА  
СТРУКТУРНИХ І ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ  
ГЕМОГЛОБІНУ В РЯДУ ХРЕБЕТНИХ**

**03.00.04 — біохімія**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук

**ЛЬВІВ — 1994**

ДВ 30.000

Робота виконана на кафедрі біохімії Симферопольського державного університету.

Науковий консультант — доктор біологічних наук,  
професор Сухомлінов Б. Ф.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,  
професор Стародуб М. Ф.;  
доктор біологічних наук,  
професор Янович В. Г.;  
доктор медичних наук,  
професор Шлемкевич М. П.

Провідна установа — Київський державний університет ім. Т. Шевченка, кафедра біохімії.

Захист дисертації відбудеться «14» грудня 1994р.  
о 10<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 020.14.01 в Інституті фізіології і біохімії тварин.

Адреса інституту: 290034, м. Львів-34, вул. В. Стуса, 38.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології і біохімії тварин.

Автореферат розісланий «11» грудня 1994р.

ЛНБ України ім.В.Стефаника



00756354 (U)

Вчений секретар  
спеціалізованої ради,  
кандидат біологічних наук

КИРИЛІВ Я. І.



## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Питання еволюції відносяться до числа загальнобіологічних проблем, вивчення яких останнім часом перенесено і на молекулярний рівень. З точки зору систематики та еволюції особливий інтерес являє порівняльне вивчення фізико-хімічних, структурних і функціональних особливостей фізіологічно активних молекул, а також молекулярних систем, які виконують в організмі важливі біологічні функції. Пізнання того, як ці молекулярні системи виникли, в якому напрямку йшов їх розвиток і як в процесі еволюції відбувалась інтеграція окремих елементів системи, являє задачу великої теоретичної важливості.

Наука, яка займається цими питаннями - порівняльна біохімія, відноситься до числа тих, які швидко розвиваються, особливо в останні два десятиріччя. Вирішення проблем порівняльної біохімії потребує все більшої уваги дослідників до вивчення гомологічних білків, які виконують однакову функцію в різних організмах / *Yaidos*, 1968; Крепс, 1976; *Kimura*, 1981/.

Раніше Крепс / 1967 / сформулював положення, яке відображає загальні принципи організації самих різних функціональних систем. Фундаментальна розробка цього положення належить А.М. Уголеву / 1985, 1989/, в якій автор доводить, що еволюційні перетворення пов'язані з перерозподілом універсальних функціональних блоків, які ідентичні або подібні в клітинах окремих представників, що знаходяться на різних етапах еволюційного розвитку. Проте, ця концепція поки що не набула належного розвитку на молекулярному рівні і, зокрема, зовсім не порушується в питаннях про еволюцію гемоглобіна.

Гемоглобін, поряд з іншими біополімерами, є одним з об'єктів філогенетичного аналізу. Найважливіша функція гемоглобіну /приєднання і транспорт кисню/ і широке розповсюдження стали причиною тої великої уваги, яку виявляли і виявляють багато дослідників до цього дихального білка. Про це свідчить багатий фонд найбільш успішних і плідних досліджень, які були виконані на протязі останніх десятиріч в спеціалізованих лабораторіях / *White*, 1977; *Hochächka*, 1980; *Perutz*, 1980, 1981, 1982; 1988, 1990; Стародуб, 1985; *Chen*, 1990/.

Дослідження гемоглобінів в еволюційному аспекті давно цікавлять дослідників. Свідченням цього є постійно збільшувачий по-

тік інформації як про структурні, так і про функціональні властивості гемоглобінів, які належать різним групам тваринного світу /Zukerkandl, 1965, 1975, 1976; Dayhoff, 1969, 1975, 1976, 1978; Goodman, 1975; Kimura, 1981, 1985; Лук'яненко, ін., 1991/.

Проте, роботи по вивченню структурних та функціональних властивостей гемоглобінів в порівняльному аспекті не мають систематичного характеру, головним чином пов'язані з дослідженням домінуючих по кількісному вмісту фракцій гемоглобінів. Інформація про структурні і функціональні властивості міnorних фракцій має досить фрагментарний характер і не дає можливості зробити цілковиту оцінку структурних і функціональних змін гемоглобіну в філогенезі.

Дана робота виникла як логічне продовження багаторічних досліджень, які проводяться на кафедрі біохімії Сімферопольського університету по вивченню білків крові, в тому числі і гемоглобіна, в порівняльно-еволюційному аспекті /Соркіна, Коношенко, Бородіна, 1977; Коношенко, ін., 1982, 1986, 1988, 1989, 1990, 1991; Остоловський, ін., 1988, 1990; Толкачова, Коношенко, Левачов, ін., 1991/.

Результати цих досліджень створять основу для порівняльної характеристики структурних і функціональних властивостей гемоглобінів хребетних в філогенетичному аспекті.

Мета і задачі досліджень. Метою роботи було - дати філогенетичну оцінку відмін в структурних і функціональних властивостях гемоглобінів на рівні класів хребетних.

Відповідно цьому, вирішувались такі задачі:

1. Дати оцінку електрофоретичної та ізоелектричної гетерогенності гемоглобінів окремих представників різних класів хребетних.

2. Охарактеризувати спорідненість до кисню як головних, так і міnorних електрофоретичних фракцій гемоглобінів. Дати філогенетичну оцінку відмін гемоглобінів за спорідненістю до кисню.

3. Охарактеризувати амінокислотний склад головних і міnorних електрофоретичних фракцій гемоглобінів, визначити характер змін в амінокислотному складі гемоглобінів у філогенетичному аспекті.

4. Вивчити внутрішньомолекулярну динаміку головних і міnorних фракцій гемоглобінів, встановити характер змін даного параметра молекул гемоглобіна у філогенезі.

5. Визначити зв'язок структурно-динамічних властивостей ге-

моглобінів з їх функціональною активністю.

Наукова новизна. Встановлено, що у філогенезі хребетних відбувалися закономірні зміни в структурних і функціональних властивостях гемоглобінів. Про це свідчать дані з амінокислотного аналізу головних і міnorних електрофоретичних фракцій гемоглобінів, відміни в рівні внутрішньомолекулярної рухливості фракцій, а також відміни в спорідненості до кисню, що корелюють зі структурно-динамічними параметрами гемоглобінів представників усіх класів хребетних.

Показано, що в характері змін спорідненості головних фракцій гемоглобінів до кисню виявляється певна закономірність. Просліджується зниження спорідненості фракцій гемоглобінів до кисню при переході від більш низьких філогенетичних груп хребетних до більш вищих.

Видова специфічність амінокислотного складу гемоглобінів обумовлена, головним чином, відмінами вмісту полярних амінокислот. Рівень вмісту гідрофобних амінокислот є більш консервативний.

В ряду хребетних спостерігається певна закономірність в характері змін співвідношення дикарбонових і основних амінокислот в складі тетрамерних гемоглобінів: зниження даного показника при ступеневому переході від класу риб до класу ссавців.

Просліджується відповідність змін співвідношення дикарбонових і основних амінокислот в гемоглобінах змінам їх спорідненості до кисню.

Вперше за даними ЯМР-релаксації в протонних системах електрофоретичних фракцій гемоглобінів встановлено, що внутрішньомолекулярна динаміка гемоглобінів характеризується філогенетичними особливостями. Показано, що в процесі філогенезу відбувалося закономірне збільшення внутрішньомолекулярної рухливості гемоглобіна.

Між станом динамічної структури гемоглобіна та його функціональною активністю просліджується корелятивний зв'язок: чим менша внутрішньомолекулярна рухливість білка, тим більша його спорідненість до кисню.

Показано, що глікозилювання гемоглобінів являє собою універсальний механізм їх модифікаційної мінливості, оскільки спостерігається в усіх групах хребетних, від круглоротих і риб до ссавців.

Одержаний експериментальний матеріал дає підставу вважати,

що у філогенезі хребетних відбувалися закономірні зміни структурно-динамічних властивостей гемоглобіна та його спорідненості до кисню, які сприяли більш ефективній віддачі кисню тканинам.

#### Теоретичне і практичне значення роботи

Проведено порівняльне дослідження структурно-функціональних властивостей гемоглобінів окремих представників різних класів хребетних в філогенетичному аспекті. Одержані результати розкривають важливий аспект проблеми порівняльної біохімії гемоглобінів, характеризують події, що відбувалися в ході розвитку і становлення їх макромолекулярних систем та пов'язані, головним чином, зі структурно-динамічними і функціональними властивостями дихального гемопротеїну.

Результати досліджень дозволяють виявити деякі закономірності в розвитку структурно-функціональних властивостей гемоглобіну в процесі філогенезу хребетних.

Розкриті закономірності в характері філогенетичних відмін функціональної активності електрофоретичних фракцій гемоглобінів.

Розкриті деякі невідомі раніше аспекти внутрішньомолекулярної рухомості гемоглобінів, встановлений зв'язок даного структурно-динамічного параметра з функціональною активністю білка.

Вперше показано, що в процесі філогенезу відбуваються закономірні зміни внутрішньомолекулярної динаміки гемоглобінів, що відповідає характеру змін їх киснево-транспортних властивостей.

Результати досліджень мають певне практичне значення для розуміння філогенетичних зв'язків між окремими групами і видами хребетних, для біохімічної систематики.

Матеріали роботи використовуються при викладанні загального курсу "Біологічна хімія і молекулярна біологія" і спеціальних курсів "Структурно-функціональні властивості білків", "Біохімія крові".

#### Апробація роботи

Матеріали дисертації були подані і докладались: на III Всесоюзному біохімічному з'їзді / Рига, 1974 р./, на IV / Дніпропетровськ, 1982 р./, V / Івано-Франківськ, 1987 р./, VI / Київ, 1992 р./ Українських біохімічних з'їздах, на XIII Українському фізіологічному з'їзді / Харків, 1990 р./, на XV міжнародній конференції "Магнітний резонанс в біологічних системах"

Єрусалим, 1992/.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація складається з введення, огляду літератури / 2 глави/, описання матеріалів і методів, результатів власних досліджень з їх обговоренням / 3 глави/, 9 висновків і списку використаної літератури / 386 джерел, в тому числі 79 вітчизняних і 307 іноземних авторів/. Дисертаційна робота викладена на 231 сторінці машинописного тексту, включаючи 45 сторінок списку літератури. Текст дисертації проілюстрований 24 таблицями і 45 рисунками.

#### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктом досліджень були статевозрілі особини представників шести класів хребетних.

Клас ссавців: людина *Homo sapiens*, бик *Bos taurus*, свиня *Sus scrofa*, гренландський тюлень *Padophilus groenlandicus*. Клас птахи: голуб *Columba livia*, домашні качки *Anas platyrhynchos*, домашні кури породи корніш *Gallus domesticus*.

Клас плазуни: черепаха середньо-азіатська *Testudo horsfieldi*, вузьководний *Natrix tessellata*.

Клас земноводні: жаба трав'яна *Rana temporaria*, жаба сіра *Bufo bufo*.

Клас кісткові риби: кефаль-сингіль *Mugil auratus*, скорпена *Scorpaena porcus*, короп *Cyprinus carpio*, товстолоб *Hypophthalmichthys molitrix*.

Представник класу круглороті - мінога річкова *Lampetra fluviatilis*.

В кожній видовій групі класу було не менше 11-ти особин.

Матеріалом досліджень був гемоглобін. Гемоглобін виділяли з еритроцитів за методом Драбкіна / *Drabkin*, 1949/, але без толуола, щоб попередити утворення метгемоглобіну. Концентрацію гемоглобіну в гемолізатах визначали уніфікованим геміглобінціанідним методом, який використовується в практиці клінічної біохімії. Електрофоретичну гетерогенність гемоглобінів визначали методом диск-електрофорезу в 7%-му поліакріламідному гелі / *Zavits*, 1964/. Електрофоретично гомогенні фракції гемоглобінів виділяли за допомогою препаративного електрофорезу в блоках 7%-ного ПААГ, використовуючи спеціально виготовлені камери / Ажицький, Багдасар'ян, 1975/.

Аналіз чистоти і гомогенності препаративно виділених фракцій проводили методом аналітичного електрофорезу в ПААГ / Davis , 1964/.

Молекулярну масу досліджуваних гемоглобінів визначали за методом гель-фільтрації в тонкому шарі сефадекса С-100 "Seperfine" / Соркіна, Коношенко, 1975/. Визначення кількісного вмісту метгемоглобіну проводили ціанметгемоглобіновим методом /Кушаковський, 1970/. Білковий компонент глобін одержували, використовуючи метод ізоляції гемової групи, розроблений Теорелом та Акесоном / Theorell , Akesson, 1955/. Кількісний вміст амінокислот в окремих фракціях гемоглобінів визначали за допомогою метода хроматографії на папері / Пасхіна, 1954; Зайцева, Тиленева, 1958/, використовуючи 24-х та 72-х годинні гідролізати білків у 6 м соляній кислоті. Кількісний вміст амінокислот визначали в мкг на 100 мкг гідролізу, та в амінокислотних залишках / Бейлі, 1965/.

Кількісний вміст глікозилізованої форми гемоглобіну визначали колориметричним методом /Данілова, Лопатіна, 1986/. Ізоелектричне фокусування гемоглобінів здійснювали в спеціальних аналітичних колонках в градієнті рН 6,0 - 8,0, який створювали сорбітом в різних концентраціях в борно-боратному буфері /рН 8,4/ та в градієнті густини сахарози / Троїцький, Ажицький, Малий, 1976/.

Внутрішньомолекулярну динаміку фракцій гемоглобінів вивчали методом ЯМР-релаксації / Вашман, Пронін, 1979, 1986; Аксенов, 1983; Федотов, 1983/. Релаксаційні показники знімали на ЯМР-релаксометрі "Minispec -120" /" Bruker ", 400 МГц при температурі 25°C. В якості досліджуваних зразків використовували 10%-ні розчини гемоглобінів у важкій воді /D<sub>2</sub>O/.

Напруженість магнітного поля була 1,7 Т, частота резонансу /  $\nu$  / - 20 МГц. Спад вільної індукції /СВІ/ реєстрували в режимі діодного детектування. Час між 90°-ними імпульсами складав 1 с. Кожна точка кривої накоплювалась 30 разів.

Для реєстрації спаду амплітуди спінового еха / CAGE/ використовували багатоімпульсну послідовність Кара-Парсела-Мейбуна-Гіла. Час між послідовностями складав 1 с. Кожна точка кривої накоплювалась біля 300 разів.

Визначення часів релаксації окремих компонент здійснювали за допомогою програмного забезпечення фірми " Bruker ".

Спорідненість електрофоретично гомогенних фракцій гемоглобінів до кисню визначали спектрофотометричним методом побудування кривих кисневої дисоціації / Шорохов, 1974/, використовували 0,5%-ні розчини гемоглобінів в 0,01 М трис-НСІ буфері, рН 7,0. Вміст метгемоглобіну в досліджуваних розчинах не перевищував 3%.

Цифрові дані, які одержували в результаті досліджень, статистично обробляли за методом малих виборок / Бейлі, 1964/. Об'єм сукупності складав, в середньому, від 11 до 15. Порівняння двох змінних величин здійснювали на основі  $\chi^2$ -критерію Стьюдента. В дисертаційній роботі говориться про зміни лише в тих випадках, коли  $P \leq 0,05$ . Для встановлення тісноти взаємозв'язку між двома показниками визначали коефіцієнт кореляції /г/.

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### І. Гетерогенність і функціональна активність гемоглобінів окремих представників хребетних

##### І.І. Характеристика фракційного складу і деяких фізико-хімічних параметрів гемоглобінів

Відповідно сучасним уявленням гетерогенність гемоглобінів - це один з найважливіших механізмів широкої адаптації до різноманітного спектру мінливих факторів як внутрішнього, так і, що особливо важливо, зовнішнього середовища.

Одержані нами дані свідчать про те, що переважна більшість вивчених гемоглобінів у представників різних класів хребетних є гетерогенні і розділюються методом електрофорезу в ПААГ на окремі фракції /рис.1/.

Більша частина досліджуваних гемоглобінів характеризується вмістом двох або трьох електрофоретично гомогенних фракцій. Виключення створюють гемоглобіни голуба, домашніх качок та гренландського тюленя. В кожній гетерогенній системі гемоглобінів можна виділити одну або дві головні фракції з найбільш високим вмістом білка та мінорні.

При аналізі даних диск-електрофореза в ПААГ спостерігається тенденція зниження відносної електрофоретичної рухливості / $K_{ef}$ / вивчених гемоглобінів в напрямку від круглоротих і риб до ссавців /табл.1/. Так, якщо величина  $K_{ef}$  головних і мінорних фракцій гемоглобінів у представників круглоротих і риб варіює в межах 0,52-0,8, то для гемоглобінів представників інших класів

хребетних значення  $K_{\text{ef}}$  помітно знижується: у земноводних - 0,41-0,59; у плазунів - 0,38-0,47; у птахів - 0,29-0,53, у наземних ссавців - 0,19-0,38;  $K_{\text{ef}}$  фракцій гемоглобіну гренландського тюленя знаходяться в межах 0,28-0,56.

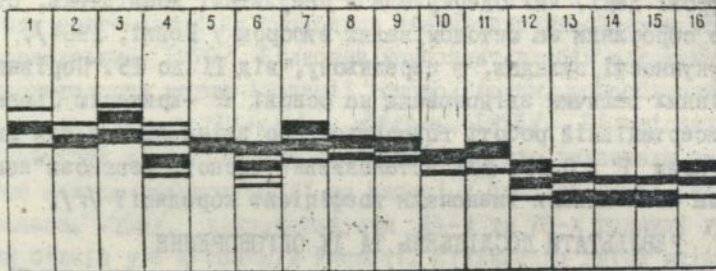


Рис. 1. Диск-електрофореграми гемоглобінів:

I - людини; 2 - бика; 3 - свині; 4 - гренландського тюленя; 5 - голуба; 6 - качок; 7 - курей; 8 - вука; 9 - черепахи; 10 - жаби трав'яної; 11 - сірої жаби; 12 - кефалі-сингіль; 13 - скорпени; 14 - товстолоба; 15 - коропа; 16 - міноги річкової.

Результати досліджень по визначенні молекулярної маси фракцій гемоглобінів показують, що її значення для досліджуваних білків є типові для гемоглобінів хребетних і знаходяться в межах 65300-66400. Виключенням є гемоглобін міноги, три фракції якого являють собою мономери / молекулярна маса фракцій 17400 - 17500/.

Таким чином, очевидно, що в кожній гетерогенній системі вивчених гемоглобінів окремі фракції характеризуються однако-вим субодичиничним складом своїх молекул, але відрізняються величиною поверхневого заряду / дані з електрофоретичної рухомості/, що може бути обумовлено певними структурними відмінностями.

Таблиця I

Показники відносного процентного вмісту та відносної електрофоретичної рухомості ( $K_{ef}$ ) електрофоретично гомогенних фракцій гемоглобінів окремих представників хребетних ( $n = II-12$ )

| Показ-<br>ники    | О б'є к т и д о с л і д ж е н н я |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                      |                     |                     |                     |                    |
|-------------------|-----------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
|                   | Людина                            |                     |                     | Бик                 |                     | Свина               |                     |                     | Тюлень               |                     |                     |                     |                    |
|                   | Нв-1                              | Нв-2*               | Нв-3                | Нв-1                | Нв-2*               | Нв-1                | Нв-2*               | Нв-3                | Нв-1                 | Нв-2                | Нв-3                | Нв-4*               | Нв-5               |
| Вміст,<br>відн. % | 2,0 $\pm$<br>0,015                | 95 $\pm$<br>0,85    | 3,0 $\pm$<br>0,017  | 5,0 $\pm$<br>0,04   | 95 $\pm$<br>0,92    | 16,7 $\pm$<br>0,14  | 46,8 $\pm$<br>0,60  | 36,5 $\pm$<br>0,48  | 11,35 $\pm$<br>0,092 | 13,3 $\pm$<br>0,095 | 11,5 $\pm$<br>0,098 | 36,5 $\pm$<br>0,50  | 27,4 $\pm$<br>0,26 |
| $K_{ef}$          | 0,21 $\pm$<br>0,006               | 0,25 $\pm$<br>0,006 | 0,33 $\pm$<br>0,007 | 0,25 $\pm$<br>0,007 | 0,35 $\pm$<br>0,007 | 0,19 $\pm$<br>0,004 | 0,24 $\pm$<br>0,006 | 0,38 $\pm$<br>0,008 | 0,28 $\pm$<br>0,006  | 0,33 $\pm$<br>0,007 | 0,42 $\pm$<br>0,009 | 0,52 $\pm$<br>0,009 | 0,56 $\pm$<br>0,01 |

| Показ-<br>ники    | О б'є к т и д о с л і д ж е н н я |                     |                     |                     |                    |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |
|-------------------|-----------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                   | Голуб                             | Качки               |                     |                     |                    | Кури                |                     |                     | Вуж                 |                     | Черепаша            |                     |
|                   | одна<br>фракція                   | Нв-1*               | Нв-2                | Нв-3                | Нв-4               | Нв-1*               | Нв-2                | Нв-3                | Нв-1*               | Нв-2                | Нв-1*               | Нв-2                |
| Вміст,<br>відн. % | 100,0                             | 42,0 $\pm$<br>0,55  | 39,0 $\pm$<br>0,51  | 7,0 $\pm$<br>0,06   | 12,0 $\pm$<br>0,1  | 47,0 $\pm$<br>0,62  | 35,0 $\pm$<br>0,43  | 18,0 $\pm$<br>0,15  | 60,0 $\pm$<br>0,72  | 40,0 $\pm$<br>0,55  | 80,0 $\pm$<br>0,90  | 20,0 $\pm$<br>0,12  |
| $K_{ef}$          | 0,43 $\pm$<br>0,008               | 0,45 $\pm$<br>0,009 | 0,49 $\pm$<br>0,009 | 0,53 $\pm$<br>0,009 | 0,67 $\pm$<br>0,01 | 0,29 $\pm$<br>0,005 | 0,43 $\pm$<br>0,008 | 0,46 $\pm$<br>0,008 | 0,38 $\pm$<br>0,008 | 0,45 $\pm$<br>0,009 | 0,39 $\pm$<br>0,007 | 0,47 $\pm$<br>0,009 |

| Показни-<br>ки   | О б'є к т и      д о с л і д ж е н н я |                            |                            |                            |                            |                            |                            |                            |                            |                           |
|------------------|----------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                  | Жаба трав.                             |                            | Жаба сіра                  |                            | Скорпена                   |                            |                            | Кефаль-сингіль             |                            |                           |
|                  | Нв-1 <sup>ж</sup>                      | Нв-2                       | Нв-1 <sup>ж</sup>          | Нв-2                       | Нв-1                       | Нв-2                       | Нв-3 <sup>ж</sup>          | Нв-1 <sup>ж</sup>          | Нв-2                       | Нв-3                      |
| Вміст,<br>відн.% | 58,0 <sup>±</sup><br>0,70              | 42,0 <sup>±</sup><br>0,59  | 62,0 <sup>±</sup><br>0,75  | 38,0 <sup>±</sup><br>0,50  | 7,0 <sup>±</sup><br>0,05   | 44,0 <sup>±</sup><br>0,60  | 49,0 <sup>±</sup><br>0,63  | 47,0 <sup>±</sup><br>0,61  | 41,0 <sup>±</sup><br>0,57  | 12,0 <sup>±</sup><br>0,09 |
| К <sub>еф</sub>  | 0,47 <sup>±</sup><br>0,008             | 0,59 <sup>±</sup><br>0,009 | 0,41 <sup>±</sup><br>0,008 | 0,59 <sup>±</sup><br>0,009 | 0,56 <sup>±</sup><br>0,009 | 0,61 <sup>±</sup><br>0,012 | 0,77 <sup>±</sup><br>0,011 | 0,54 <sup>±</sup><br>0,009 | 0,63 <sup>±</sup><br>0,011 | 0,75 <sup>±</sup><br>0,01 |

| Показни-<br>ки   | О б'є к т и      д о с л і д ж е н н я |                            |                            |                            |                            |                            |                            |
|------------------|----------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                  | Короп                                  |                            | Товстолоб                  |                            | Мінога                     |                            |                            |
|                  | Нв-1                                   | Нв-2 <sup>ж</sup>          | Нв-1                       | Нв-2 <sup>ж</sup>          | Нв-1 <sup>ж</sup>          | Нв-2                       | Нв-3                       |
| Вміст,<br>відн.% | 33,0 <sup>±</sup><br>0,38              | 67,0 <sup>±</sup><br>0,83  | 32,0 <sup>±</sup><br>0,30  | 68,0 <sup>±</sup><br>0,82  | 64,5 <sup>±</sup><br>0,69  | 22,3 <sup>±</sup><br>0,18  | 13,2 <sup>±</sup><br>0,10  |
| К <sub>еф</sub>  | 0,60 <sup>±</sup><br>0,01              | 0,80 <sup>±</sup><br>0,011 | 0,55 <sup>±</sup><br>0,009 | 0,77 <sup>±</sup><br>0,013 | 0,52 <sup>±</sup><br>0,009 | 0,63 <sup>±</sup><br>0,009 | 0,78 <sup>±</sup><br>0,012 |

ж - фракції з найбільш високим вмістом білка.

## 1.2. Ізоелектрична гетерогенність гемоглобінів

Методом ізоелектрофокусування в градієнті рН встановлений більш високий рівень гетерогенності гемоглобінів. При ізоелектрофокусуванні гемоглобіни розділяються на 2-6-ть ізоелектричних компонентів в межах рН 6,24 - 7,81 /рис.2-4, табл.2/. Для більшості гемоглобінів кількість ізоелектричних компонентів нараховувалась від 4-х до 6-ти. В ізоелектричних спектрах можна виділити компоненти з найбільш високим вмістом білка та мікорні.

Величини рІ головних компонентів знаходяться в межах, близьких до нейтральних або слаболужних значень рН /від 6,84 до 7,65/. Характер ізоелектричних спектрів має видову специфічність. Виявлені достовірні  $P \leq 0,05$  відмінні як в кількості ізоелектричних компонентів, так і в значеннях їх рІ.

Як і при електрофорезі в ПААГ просліджується тенденція загального зниження "кислотності" білка від круглоротих і риб до ссавців, що виявляється, зокрема, в підвищенні рІ головних компонентів.

Слід відмітити, що досі остаточно не вирішено питання про природу так званої "мікрогетерогенності" гемоглобінів, що виявляється методами ізоелектричного фокусування. В літературі обговорюється питання про те, що однією з причин "мікрогетерогенності" білків можуть бути їх постсинтетичні модифікації /Троїцький, Ажицький, 1984; Стародуб, 1985/. До таких модифікацій відноситься й неферментативне глікозилювання /Галенок, Боднар, Диккер, Ромашкін, 1989/.

В зв'язку з тим було доцільним виявити в складі ізоелектричних спектрів глікозилювану форму гемоглобіну. Було встановлено, що всі ізоелектричні спектри мають один глікозилюваний компонент, який локалізується в зоні слабокислих значень рН - градієнта /табл. 3/.

Ці дані свідчать про те, що глікозилювання є однією з причин поширення меж гетерогенності гемоглобінів та являє собою універсальний механізм їх модифікаційної мінливості, оскільки спостерігається у всіх групах хребетних: від круглоротих і риб до ссавців.

Очевидно, в ізоелектричних спектрах відображається більш різноманітний склад гетерогенної системи гемоглобіну, де є як

Таблиця 2

Характеристика ізоелектричних компонентів гемоглобінів  
окремих представників хребетних (n = 7-9)

| Клас хребетних: | Гемоглобін:    | pI ізоелектричних компонентів (M <sup>±m</sup> ) |                        |                          |                          |                         |                          |
|-----------------|----------------|--------------------------------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
|                 |                | I                                                | II                     | III                      | IV                       | V                       | VI                       |
| I               | 2              | 3                                                | 4                      | 5                        | 6                        | 7                       | 8                        |
| Ссавці          | Людини         | 6,36±0,008                                       | 6,49±0,01              | 7,00±0,009               | 7,42 <sup>*</sup> ±0,015 | 7,6±0,014               | -                        |
|                 | Бика           | 6,6 ±0,015                                       | 7,0 ±0,03              | 7,5 <sup>*</sup> ±0,025  | 7,75 ±0,03               | -                       | -                        |
|                 | Свині          | 6,29±0,03                                        | 6,57±0,04              | 6,85±0,038               | 7,36 <sup>*</sup> ±0,024 | 7,65±0,06               | -                        |
|                 | Тюленя         | 6,73±0,01                                        | 7,0 ±0,02              | 7,28 <sup>*</sup> ±0,03  | 7,39 ±0,02               | 7,5 ±0,015              | 7,62 <sup>*</sup> ±0,025 |
| Птахи           | Голуба         | 6,8 ±0,013                                       | 7,7 <sup>*</sup> ±0,02 | -                        | -                        | -                       | -                        |
|                 | Качок          | 6,4 ±0,04                                        | 6,58±0,05              | 6,84 <sup>*</sup> ±0,02  | 6,99 <sup>*</sup> ±0,01  | 7,3 ±0,03               | 7,56 <sup>*</sup> ±0,02  |
|                 | Курей          | 6,4 ±0,01                                        | 6,5 ±0,01              | 6,68±0,02                | 7,04 <sup>*</sup> ±0,03  | 7,54±0,032              | -                        |
| Плазуни         | Вужа           | 6,7 ±0,02                                        | 7,15±0,008             | 7,48 <sup>*</sup> ±0,009 | 7,65 <sup>*</sup> ±0,01  | -                       | -                        |
|                 | Черепахи       | 6,62±0,03                                        | 7,09±0,01              | 7,35 <sup>*</sup> ±0,01  | 7,69 ±0,02               | -                       | -                        |
| Земноводні      | Жаби трав'яної | 6,65±0,02                                        | 6,73±0,015             | 7,25 <sup>*</sup> ±0,01  | 7,46 ±0,02               | 7,56±0,008              | -                        |
|                 | Жаби сірої     | 6,46±0,025                                       | 6,78±0,02              | 7,2 ±0,015               | 7,46 ±0,01               | 7,55 <sup>*</sup> ±0,01 | 7,76 ±0,009              |

| 1         | 2               | 3         | 4                        | 5                       | 6                        | 7                       | 8 |
|-----------|-----------------|-----------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|---|
| Риби      | Скорпени        | 6,5 ±0,01 | 6,9 <sup>*</sup> ±0,03   | 7,3 ±0,017              | 7,5 ±0,015               | 7,7 ±0,03               | - |
|           | Кефаль-син-гіль | 6,24±0,03 | 6,93 <sup>*</sup> ±0,019 | 7,24±0,016              | 7,63 <sup>*</sup> ±0,024 | 7,81±0,01               | - |
|           | Товстолоба      | 6,45±0,06 | 6,65 ±0,11               | 7,26 <sup>*</sup> ±0,12 | 7,47 ±0,04               | 7,62 <sup>*</sup> ±0,08 | - |
|           | Коропа          | 6,8 ±0,03 | 7,27 <sup>*</sup> ±0,04  | 7,39 <sup>*</sup> ±0,03 | 7,62 ±0,02               | -                       | - |
| Круглорот | Міноги річкової | 6,38±0,01 | 6,82 ±0,03               | 7,12 <sup>*</sup> ±0,02 | 7,46 <sup>*</sup> ±0,045 | -                       | - |

\* - компоненти з найбільш високим вмістом білка.

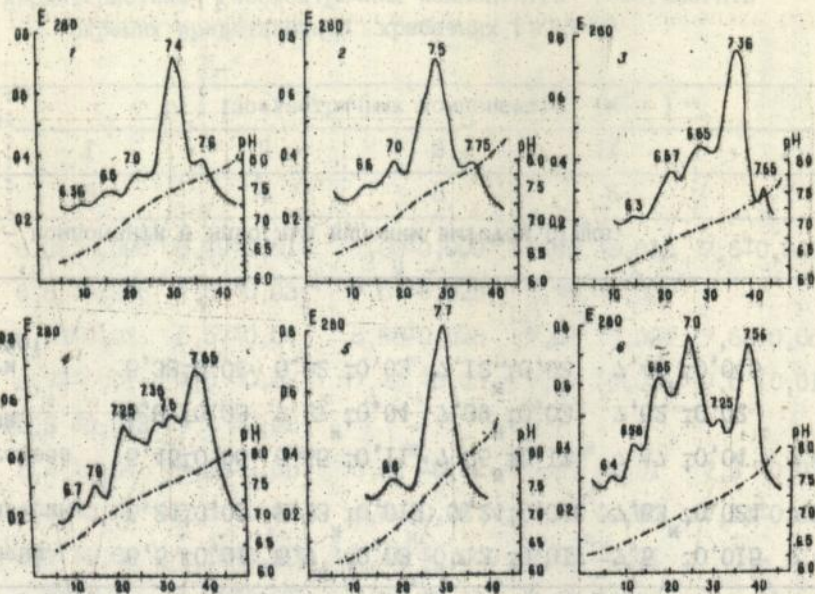


Рис. 2. Ізоелектричні спектри гемоглобінів: людини (1), бика (2), свині (3), тюреля (4), голуба (5), качок (6).

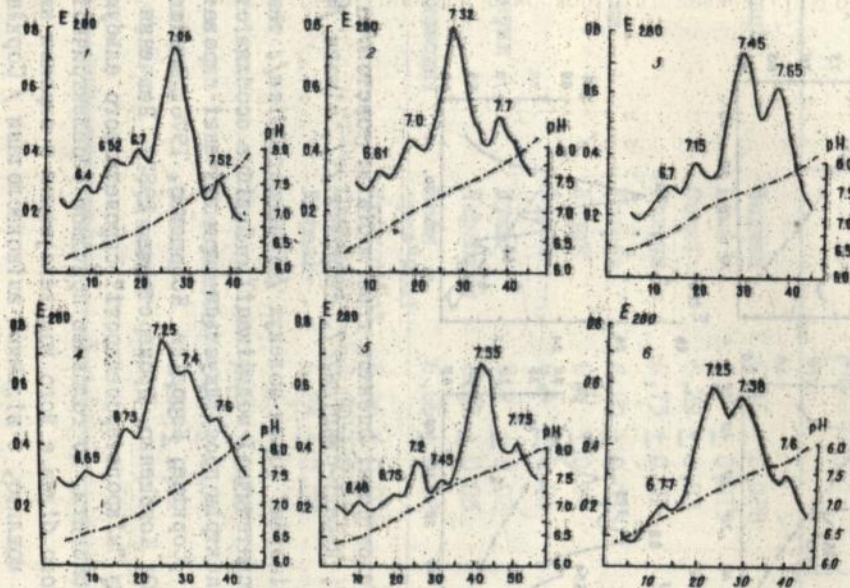


Рис. 3. Ізоелектричні спектри гемоглобінів: курей (1), черепахи (2), вужа (3), жаби трав'яної (4), жаби сірої (5), коропа (6).

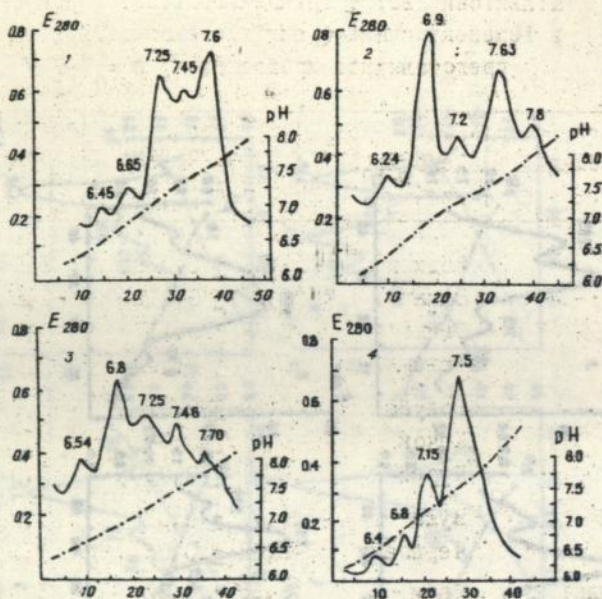


Рис. 4. Ізоелектричні спектри гемоглобінів: товстолоба /1/, кефалі-сінгіль /2/, скорпени /3/, міноги /4/.

генетично детерміновані форми молекул /ізогемоглобіни/, так і продукти їх постсинтетичної модифікації. Подібна особливість ізоелектричних спектрів просліджується при вивченні сироваткового альбуміну /Соркіна, Бородіна, Коношенко, 1976; Коношенко, Павлова, 1980; Коношенко, Дромаретська, 1982/. Вивчення питання про природу "мікрогетерогенності" сироваткового альбуміну дозволило встановити, що головною причиною ізоелектричної гетерогенності даного білка є його комплексування з жирними кислотами, а також, можливо, з вільними амінокислотами /Соркіна, Коношенко, Бородіна, 1977; Соркіна, Коношенко, Івлєв, 1978/.

В літературі є також дані про глікозилювання сироваткового альбуміну /Garlick, Janathan, 1983/.

Таким чином, для різних білків можлива реалізація як специфічних, так і загальних механізмів постсинтетичної модифікації /наприклад, глікозилювання/, що приводить до появи "популяцій" молекул з новими фізико-хімічними властивостями.

Таблиця 3

Кількісний вміст глікозилюваної форми білка  
в ізоелектричних фракціях гемоглобінів окремих  
представників хребетних / n = 7-9 /

| Клас хребетних | Гемоглобін      | p I ізоелектричного компонента | Вміст глікозилюваного гемоглобіну, % |
|----------------|-----------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| Ссавці         | Людини          | $6,36 \pm 0,008$               | $3,5 \pm 0,21$                       |
|                | Бика            | $6,6 \pm 0,015$                | $2,8 \pm 0,22$                       |
|                | Свині           | $6,29 \pm 0,03$                | $3,2 \pm 0,18$                       |
|                | Тюленя          | $6,73 \pm 0,01$                | $2,0 \pm 0,18$                       |
| Птахи          | Голуба          | $6,80 \pm 0,013$               | $2,8 \pm 0,17$                       |
|                | Качок           | $6,4 \pm 0,04$                 | $3,1 \pm 0,25$                       |
|                | Курей           | $6,4 \pm 0,01$                 | $3,0 \pm 0,21$                       |
| Плазуни        | Вужа            | $6,7 \pm 0,02$                 | $3,2 \pm 0,25$                       |
|                | Черепахи        | $6,62 \pm 0,03$                | $3,0 \pm 0,23$                       |
| Земноводні     | Жаби трав'яної  | $6,65 \pm 0,02$                | $3,2 \pm 0,20$                       |
|                | Жаби сірої      | $6,46 \pm 0,025$               | $3,3 \pm 0,25$                       |
| Риби           | Скorpени        | $6,50 \pm 0,01$                | $4,0 \pm 0,26$                       |
|                | Кефалі-смингіль | $6,24 \pm 0,03$                | $3,9 \pm 0,18$                       |
|                | Коропа          | $6,8 \pm 0,03$                 | $4,2 \pm 0,28$                       |
|                | Товстолоба      | $6,45 \pm 0,06$                | $4,3 \pm 0,25$                       |
| Круглороті     | Міноги          | $6,38 \pm 0,01$                | $3,8 \pm 0,19$                       |
|                | річкової        |                                |                                      |

ЛНБ ім. В. Стефаника  
АН України

Таблиця 4

Показники полунасичення киснем ( $P_{50}$ , мм рт.ст.) електрофоретично гомогенних фракцій гемоглобінів окремих представників хребетних ( $M^{\pm}$  ;  $n = 7-8$  )

| Людина       |              |              | Бик          |              |              | Свиня        |              |               | Тюлень         |              |              |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|----------------|--------------|--------------|
| Нв-1         | Нв-2*        | Нв-3         | Нв-1         | Нв-2*        | Нв-1         | Нв-2*        | Нв-3         | Нв-1          | Нв-2           | Нв-3         | Нв-4*        |
| 20 $\pm$ 1,1 | 26 $\pm$ 0,9 | 17 $\pm$ 1,0 | 17 $\pm$ 0,9 | 26 $\pm$ 1,1 | 22 $\pm$ 1,0 | 25 $\pm$ 0,8 | 18 $\pm$ 0,9 | 33 $\pm$ 0,9  | 32 $\pm$ 1,0   | 28 $\pm$ 0,9 | 22 $\pm$ 1,1 |
| Голуб        |              |              | Качки        |              |              | Кури         |              |               | Вуж            |              |              |
| Нв-5         | одна фракція | Нв-1*        | Нв-2         | Нв-3         | Нв-4         | Нв-1*        | Нв-2         | Нв-3          | Нв-1*          | Нв-2         |              |
| 35 $\pm$ 0,9 | 30 $\pm$ 1,1 | 31 $\pm$ 1,1 | 31 $\pm$ 1,0 | 37 $\pm$ 1,1 | 27 $\pm$ 1,0 | 29 $\pm$ 0,7 | 25 $\pm$ 0,6 | 27 $\pm$ 0,65 | 27 $\pm$ 0,9   | 23 $\pm$ 0,9 |              |
| Черепаша     |              | Жаба трав.   |              | Жаба сіра    |              | Скорпена     |              |               | Кефаль-сингіль |              |              |
| Нв-1*        | Нв-2         | Нв-1*        | Нв-2         | Нв-1*        | Нв-2         | Нв-1         | Нв-2         | Нв-3*         | Нв-1*          | Нв-2         | Нв-3         |
| 25 $\pm$ 0,8 | 22 $\pm$ 1,1 | 22 $\pm$ 0,9 | 17 $\pm$ 1,1 | 25 $\pm$ 0,9 | 20 $\pm$ 1,0 | 13 $\pm$ 0,8 | 17 $\pm$ 0,9 | 15 $\pm$ 0,8  | 20 $\pm$ 0,8   | 18 $\pm$ 0,9 | 14 $\pm$ 1,1 |
| Короп        |              | Товстолоб    |              | Мінога       |              |              |              |               |                |              |              |
| Нв-1         | Нв-2*        | Нв-1         | Нв-2*        | Нв-1*        | Нв-2         | Нв-3         |              |               |                |              |              |
| 12 $\pm$ 0,6 | 17 $\pm$ 0,8 | 13 $\pm$ 0,6 | 18 $\pm$ 0,7 | 17 $\pm$ 0,9 | 20 $\pm$ 0,8 | 13 $\pm$ 1,1 |              |               |                |              |              |

\* - фракції з найбільш високим вмістом білка.

\* - фракції з найбільш високим вмістом білка.

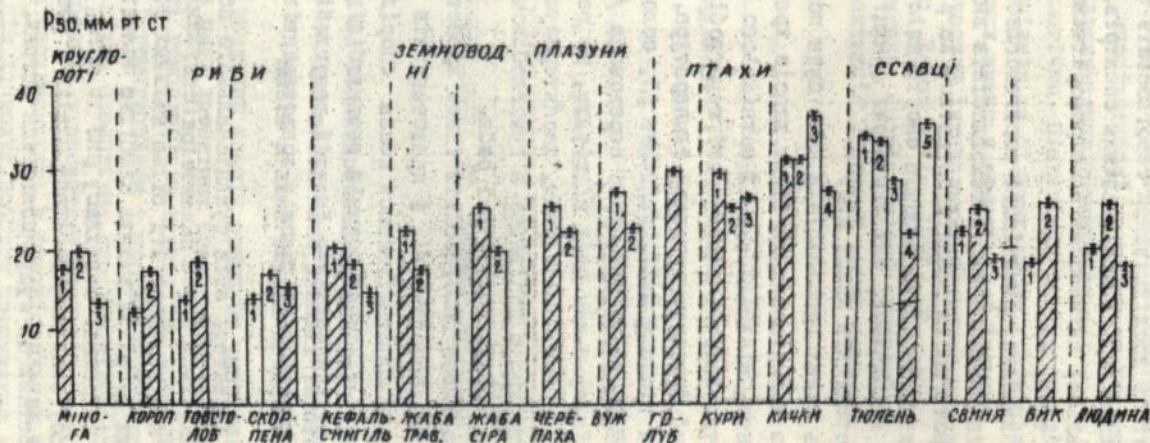


Рис. 5. Порівняльна характеристика спорідненості до кисню головних (заштриховано) і мінорних електрофоретично гомогенних фракцій гемоглобінів окремих представників хребтних (цифрами позначені номери фракцій).

## І.2. Характеристика спорідненості електрофоретично гомогенних фракцій гемоглобінів до кисню

Видова специфічність досліджуваних гемоглобінів спостерігається не тільки в характері ізоелектричних спектрів, але також в ступені функціональної активності електрофоретично гомогенних фракцій /рис. 5, табл. 4/.

Вивчення кривих кислотної дисоціації оксигемоглобінів показало, що функціональна гетерогенність гемоглобінів видоспецифічна і є проявом широти норми реакції організму на різні умови середовища існування. Найбільш високою спорідненістю до кисню характеризуються як головні, так і міnorні фракції гемоглобінів многи та представників класу риб.

Така особливість даних гемоглобінів може бути пов'язана з тим, що порівняно з представниками інших класів хребетних, риби існують в складних, мінливих умовах зовнішнього середовища, коли на киснево-транспортні властивості гемоглобіну впливають певні екологічні фактори, зокрема, температура, швидкість плавуч, глибина, вміст кисню у воді, величина рН, солоність, іонний склад зовнішнього та внутрішнього середовища /Лук'яненко, ін., 1991/. В зв'язку з цим слід відмітити, що гемоглобін скорпени - придонної, малорухливої риби, характеризується більшою спорідненістю до кисню порівняно з гемоглобіном кефалі-саягіль - вищогої, активної, пелагічної риби.

Спорідненість до кисню гемоглобінів інших хребетних також має певні філогенетичні особливості. У представників класів земноводних та плазунів спостерігається менша спорідненість до кисню як головних так і міnorних фракцій гемоглобінів. Ця особливість функціональних властивостей фракцій гемоглобінів, але в більшій мірі, спостерігається також у представників класу птахів.

Таким чином, в характері змін функціонального показника гемоглобінів просліджується певна закономірність: зниження спорідненості до кисню при переході від більш низьких філогенетичних груп хребетних до більш вищих. Найбільш значні зміни спостерігаються при переході від класу риб до класу земноводних, а також від класу плазунів до класу птахів /рис. 6/. Очевидно, вихід хребетних на сушу, появлення легень, еволюційно сформована здатність підтримувати постійну температуру тіла

у птахів та ссавців і, в зв'язку з цим, інтенсифікація метаболізму, — все це з'явилося рушійною силою певних змін киснево-транспортних властивостей гемоглобінів в напрямку зниження їх спорідненості до кисню та підвищення ефективності на етапі розвантаження в тканинах.

Аналогічна біохімічна логіка просліджується при адаптації організмів до більших висот, коли різко змінюється парціальний тиск кисню в атмосфері /Дударев, 1979/, а також під впливом частих інтенсивних фізичних навантажень /Толкачова, Коношенко, Левачев, ін., 1991/. В процесі адаптації відбувається зниження спорідненості гемоглобіну до кисню, що сприяє більш ефективній передачі кисню тканинам.

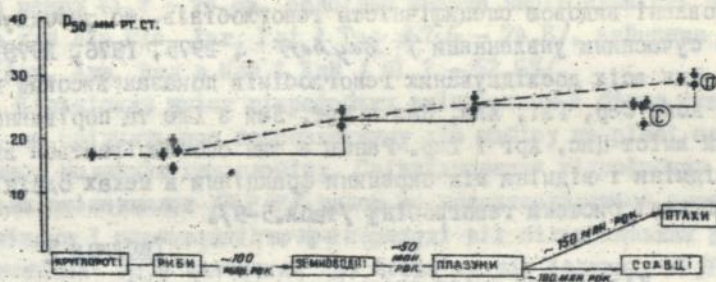


Рис. 6. Філогенетична оцінка змін спорідненості до кисню головних фракцій гемоглобінів представників різних класів хребетних.

Порівняльний аналіз даних за спорідненістю до кисню показав, що в ряду хребетних спостерігаються зміни функціональної активності гемоглобінів відповідно принципу "каскада": головні фракції гемоглобінів у представників попереднього класу мають таку ж або аналогічну спорідненість до кисню, що й окремі мінорні фракції у представників наступного класу /рис.5/.

Така спадкоємність в функціональних властивостях фракцій гемоглобінів дозволяє зробити припущення про можливість спрямованої реалізації на молекулярному рівні пам'яті про минулий етап еволюції /"еволюційна пам'ять"/, що повинно мати в філо-

генезі певне адаптивне значення. Мають, окремі мінорні фракції гемоглобінів є еволюційно більш ранні і кодуються генами, які колись могли бути домінуючими.

## 2. філогенетичні особливості структурних властивостей гемоглобінів хребетних

### 2.1. Порівняльна характеристика амінокислотного складу електрофоретично гомогенних фракцій гемоглобінів хребетних

Дослідження амінокислотного складу та внутрішньомолекулярної рухомості фракцій дозволило встановити деякі закономірності і філогенетичні особливості в структурно-функціональному взаємозв'язку гемоглобінів.

Проведений нами аналіз амінокислотного складу електрофоретично гомогенних фракцій гемоглобінів виявляє як загальні особливості кількісного вмісту амінокислот так і відмінні, які обумовлені видовою специфічністю гемоглобінів, що узгоджується з сучасними уявленнями / Dayhoff, 1975, 1976, 1978/.

Для всіх досліджуваних гемоглобінів показан високий вміст Ліз, Асп, Сер, Глі, Ала, Вал з Мет, Лей з Іле та порівняно низький вміст Цис, Арг і Тир. Разом з тим спостерігаються видові відмінні і відмінні між окремими фракціями в межах однієї гетерогенної системи гемоглобіну /табл.5-9/.

**Таблиця 5**

Кількісний вміст амінокислот в електрофоретично гомогенних фракціях гемоглобіну міноги / мкг на 100 мкг гідролізату білка; n = 11-15/

| Амінокислоти | Ф р а к ц і я |              |              |
|--------------|---------------|--------------|--------------|
|              | Нв - 1        | Нв - 2       | Нв - 3       |
| 1            | 2             | 3            | 4            |
| Цис          | 2,32 ± 0,05   | 2,7 ± 0,44   | 2,51 ± 0,05  |
| Ліз          | 8,23 ± 0,28   | 8,10 ± 0,50  | 5,10 ± 0,45  |
| Гіс          | 3,27 ± 0,50   | 5,98 ± 0,50  | 4,96 ± 0,35  |
| Арг          | 4,04 ± 0,46   | 5,17 ± 0,41  | 3,18 ± 0,50  |
| Асп          | 8,68 ± 0,50   | 10,83 ± 0,45 | 6,30 ± 0,35  |
| Сер          | 8,70 ± 0,45   | 10,10 ± 0,50 | 8,02 ± 0,29  |
| Глі          | 11,0 ± 0,50   | 10,65 ± 0,45 | 13,60 ± 0,50 |
| Глу          | 5,85 ± 0,25   | 9,60 ± 0,50  | 11,23 ± 0,45 |

|           | 1            | 2           | 3           | 4 |
|-----------|--------------|-------------|-------------|---|
| Тре       | 5,70 ± 0,32  | 5,36 ± 0,45 | 2,82 ± 0,21 |   |
| Ала       | 10,30 ± 0,45 | 7,80 ± 0,30 | 7,95 ± 0,45 |   |
| Тир       | 4,35 ± 0,40  | 5,66 ± 0,30 | 5,38 ± 0,25 |   |
| Вал + Met | 10,43 ± 0,50 | 9,70 ± 0,45 | 7,50 ± 0,48 |   |
| Фен       | 7,94 ± 0,38  | 5,54 ± 0,40 | 7,42 ± 0,50 |   |
| Лей + Іле | 8,20 ± 0,48  | 9,80 ± 0,45 | 10,0 ± 0,45 |   |

Характер відмін між фракціями гемоглобінів є специфічний для кожного виду хребетних. Проте, всі досліджувані білки відрізняються вмістом, перш за все, полярних амінокислот, для яких встановлен найбільш високий рівень варіабельності /табл.ІО/.

Варіабельність для всього набору амінокислот встановлена в межах 41,7 - 74,8%. Найбільш висока варіабельність показана для Лів, Гіс, Арг, Глі і Тре /67,6 - 74,8/, найменша - для Асп, Ала, Вал з Met і Лей /41,7 - 52,6%/.

Кількісний вміст гідрофобних амінокислот є більш стабільним, що свідчить про консервативну дію добіру на рівні окремих ділянок молекули гемоглобіну. Співвідношення гідрофобних та полярних амінокислот  $[N/P]$  також не характеризується значними відмінностями і спрямованістю при переході від більш низьких філогенетичних груп хребетних до більш вищих. Величина  $N/P$  для вивчених гемоглобінів знаходиться в межах 0,56 - 0,85. Для більшості фракцій гемоглобінів цей показник дорівнює 0,60 - 0,65 /табл.ІІ/. Оскільки ця особливість амінокислотного складу гемоглобінів виявляється у всіх групах хребетних в підставі припущати, що певні структурні блоки білкової молекули /наприклад, гемові "кишені"/, у формуванні яких зайняті, переважно, гідрофобні амінокислотні залишки, головним чином сформувались на ранньому етапі еволюції гемоглобіну. Дальші незначні зміни гідрофобних ділянок білкової молекули в процесі філогенезу могли сприяти удосконаленню структурно-функціональних властивостей гемоглобіну.

Одержані результати свідчать про те, що відмінності між фракціями гемоглобінів в кількісному вмісті більшості амінокислот є різноспрямованими. Спрямовано змінюється /зростає/ вміст Арг та Сер в головних і окремих мінорних фракціях гемоглобінів в

Таблица 6

Кількісний вміст амінокислот в електрофоретично гомогенних фракціях  
гемоглобінів окремих представників класу риб (мкг на 100 мкг гідролізату  
білка; n = 11-15)

| Амінокис-<br>лоти | Короп                     |                           | Тонстолоб                 |                           | Скорпена                  |                           |                            | Кефаль-сингіль            |                            |                            |
|-------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                   | Нв-І                      | Нв-2 *                    | Нв-І                      | Нв-2 *                    | Нв-І                      | Нв-2                      | Нв-3 *                     | Нв-І *                    | Нв-2                       | Нв-3                       |
| I                 | 2                         | 3                         | 4                         | 5                         | 6                         | 7                         | 8                          | 9                         | 10                         | 11                         |
| Цис               | 4,57 <sup>±</sup><br>0,36 | 5,2 <sup>±</sup><br>0,50  | 4,77 <sup>±</sup><br>0,5  | 5,5 <sup>±</sup><br>0,36  | 3,0 <sup>±</sup><br>0,42  | 3,95 <sup>±</sup><br>0,45 | 3,92 <sup>±</sup><br>0,5   | 3,9 <sup>±</sup><br>0,4   | 3,85 <sup>±</sup><br>0,45  | 3,5 <sup>±</sup><br>0,5    |
| Ліз               | 6,38 <sup>±</sup><br>0,21 | 3,98 <sup>±</sup><br>0,3  | 6,69 <sup>±</sup><br>0,27 | 4,02 <sup>±</sup><br>0,14 | 7,52 <sup>±</sup><br>0,4  | 7,45 <sup>±</sup><br>0,35 | 6,04 <sup>±</sup><br>0,42  | 8,0 <sup>±</sup><br>0,36  | 6,58 <sup>±</sup><br>0,40  | 6,55 <sup>±</sup><br>0,45  |
| Гіо               | 3,39 <sup>±</sup><br>0,22 | 3,15 <sup>±</sup><br>0,5  | 3,23 <sup>±</sup><br>0,24 | 3,27 <sup>±</sup><br>0,3  | 5,5 <sup>±</sup><br>0,45  | 5,2 <sup>±</sup><br>0,50  | 4,0 <sup>±</sup><br>0,36   | 4,2 <sup>±</sup><br>0,45  | 4,25 <sup>±</sup><br>0,38  | 4,50 <sup>±</sup><br>0,40  |
| Арг               | 2,4 <sup>±</sup><br>0,14  | 2,55 <sup>±</sup><br>0,2  | 4,63 <sup>±</sup><br>0,3  | 3,03 <sup>±</sup><br>0,15 | 4,1 <sup>±</sup><br>0,28  | 3,72 <sup>±</sup><br>0,40 | 4,53 <sup>±</sup><br>0,35  | 6,0 <sup>±</sup><br>0,25  | 5,90 <sup>±</sup><br>0,45  | 3,50 <sup>±</sup><br>0,35  |
| Асп               | 10,4 <sup>±</sup><br>0,25 | 9,25 <sup>±</sup><br>0,3  | 12,3 <sup>±</sup><br>0,18 | 9,9 <sup>±</sup><br>0,3   | 10,8 <sup>±</sup><br>0,20 | 12,55 <sup>±</sup><br>0,3 | 14,25 <sup>±</sup><br>0,32 | 12,0 <sup>±</sup><br>0,28 | 13,86 <sup>±</sup><br>0,35 | 13,70 <sup>±</sup><br>0,28 |
| Сер               | 5,68 <sup>±</sup><br>0,49 | 5,69 <sup>±</sup><br>0,25 | 5,98 <sup>±</sup><br>0,5  | 6,0 <sup>±</sup><br>0,17  | 4,5 <sup>±</sup><br>0,48  | 6,4 <sup>±</sup><br>0,20  | 5,0 <sup>±</sup><br>0,49   | 7,12 <sup>±</sup><br>0,50 | 5,63 <sup>±</sup><br>0,25  | 4,50 <sup>±</sup><br>0,45  |

| I       | 2                         | 3                          | 4                         | 5                         | 6                         | 7                         | 8                          | 9                          | 10                         | 11                        |
|---------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| ГлI     | 16,9 <sup>±</sup><br>0,5  | 12,09 <sup>±</sup><br>0,22 | 14,8 <sup>±</sup><br>0,12 | 8,0 <sup>±</sup><br>0,21  | 5,62 <sup>±</sup><br>0,23 | 5,5 <sup>±</sup><br>0,45  | 4,61 <sup>±</sup><br>0,40  | 5,15 <sup>±</sup><br>0,38  | 4,60 <sup>±</sup><br>0,50  | 6,80 <sup>±</sup><br>0,22 |
| ГлУ     | 7,46 <sup>±</sup><br>0,48 | 9,76 <sup>±</sup><br>0,44  | 7,2 <sup>±</sup><br>0,4   | 9,49 <sup>±</sup><br>0,11 | 12,3 <sup>±</sup><br>0,17 | 11,9 <sup>±</sup><br>0,35 | 13,2 <sup>±</sup><br>0,15  | 11,82 <sup>±</sup><br>0,20 | 12,0 <sup>±</sup><br>0,48  | 13,9 <sup>±</sup><br>0,50 |
| Тре     | 2,77 <sup>±</sup><br>0,20 | 3,10 <sup>±</sup><br>0,3   | 3,70 <sup>±</sup><br>0,35 | 3,50 <sup>±</sup><br>0,10 | 6,54 <sup>±</sup><br>0,15 | 4,80 <sup>±</sup><br>0,22 | 5,84 <sup>±</sup><br>0,38  | 5,60 <sup>±</sup><br>0,42  | 6,20 <sup>±</sup><br>0,50  | 4,80 <sup>±</sup><br>0,45 |
| Ала     | 7,6 <sup>±</sup><br>0,3   | 7,32 <sup>±</sup><br>0,2   | 7,8 <sup>±</sup><br>0,40  | 6,65 <sup>±</sup><br>0,10 | 7,82 <sup>±</sup><br>0,25 | 7,6 <sup>±</sup><br>0,48  | 8,0 <sup>±</sup><br>0,40   | 8,20 <sup>±</sup><br>0,50  | 7,52 <sup>±</sup><br>0,28  | 8,1 <sup>±</sup><br>0,35  |
| Тир     | 5,5 <sup>±</sup><br>0,45  | 5,0 <sup>±</sup><br>0,5    | 5,3 <sup>±</sup><br>0,45  | 4,96 <sup>±</sup><br>0,33 | 3,0 <sup>±</sup><br>0,38  | 3,0 <sup>±</sup><br>0,26  | 4,8 <sup>±</sup><br>0,35   | 4,0 <sup>±</sup><br>0,42   | 3,50 <sup>±</sup><br>0,36  | 4,50 <sup>±</sup><br>0,45 |
| Вал+Мет | 9,5 <sup>±</sup><br>0,40  | 9,12 <sup>±</sup><br>0,5   | 9,1 <sup>±</sup><br>0,35  | 9,9 <sup>±</sup><br>0,32  | 8,35 <sup>±</sup><br>0,40 | 9,86 <sup>±</sup><br>0,5  | 6,48 <sup>±</sup><br>0,45  | 8,5 <sup>±</sup><br>0,49   | 9,0 <sup>±</sup><br>0,50   | 9,43 <sup>±</sup><br>0,50 |
| Фен     | 5,7 <sup>±</sup><br>0,2   | 8,5 <sup>±</sup><br>0,49   | 6,1 <sup>±</sup><br>0,23  | 8,83 <sup>±</sup><br>0,18 | 7,85 <sup>±</sup><br>0,42 | 6,50 <sup>±</sup><br>0,45 | 7,25 <sup>±</sup><br>0,40  | 7,58 <sup>±</sup><br>0,38  | 7,84 <sup>±</sup><br>0,41  | 7,5 <sup>±</sup><br>0,45  |
| Лей-Іле | 10,7 <sup>±</sup><br>0,5  | 9,84 <sup>±</sup><br>0,5   | 10,0 <sup>±</sup><br>0,48 | 9,32 <sup>±</sup><br>0,21 | 13,4 <sup>±</sup><br>0,35 | 12,75 <sup>±</sup><br>0,4 | 12,78 <sup>±</sup><br>0,30 | 13,0 <sup>±</sup><br>0,28  | 13,45 <sup>±</sup><br>0,25 | 12,0 <sup>±</sup><br>0,45 |

ж - фракції з найбільш високим вмістом білка.

Таблиця 7

Кількісний вміст амінокислот в електрофоретично гомогенних фракціях  
гемоглобінів окремих представників класів земноводних і плазунів  
(мкг на 100 мкг гідролізату білка, n = 11-15)

| Аміно-<br>кислоти | Жаба трав'яна |            | Жаба сіра  |           | Вуж       |           | Черепаша  |            |
|-------------------|---------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
|                   | Нв-1*         | Нв-2       | Нв-1*      | Нв-2      | Нв-1*     | Нв-2      | Нв-1*     | Нв-2       |
| Цис               | 2,85±0,30     | 2,43±0,40  | 2,80±0,50  | 3,00±0,28 | 2,75±0,50 | 2,70±0,36 | 2,90±0,30 | 3,0±0,20   |
| Ліз               | 9,38±0,50     | 6,30±0,28  | 7,13±0,16  | 6,90±0,45 | 7,90±0,50 | 8,20±0,48 | 8,20±0,48 | 9,0±0,40   |
| Гіс               | 8,76±0,50     | 6,20±0,32  | 6,59±0,48  | 5,10±0,30 | 7,50±0,45 | 6,90±0,36 | 7,50±0,25 | 5,80±0,24  |
| Арг               | 3,44±0,30     | 4,57±0,50  | 5,33±0,50  | 3,79±0,50 | 5,90±0,25 | 3,90±0,18 | 4,00±0,40 | 3,20±0,42  |
| Асп               | 14,9±0,50     | 10,0±0,25  | 6,75±0,20  | 7,96±0,50 | 12,0±0,18 | 13,1±0,29 | 9,20±0,30 | 10,8±0,25  |
| Сер               | 6,4 ±0,45     | 6,75±0,50  | 7,81±0,50  | 7,01±0,40 | 9,0±0,22  | 9,80±0,48 | 8,30±0,45 | 6,40±0,25  |
| Глі               | 8,07±0,50     | 9,62±0,50  | 8,95±0,49  | 6,61±0,50 | 7,0±0,45  | 6,50±0,50 | 6,80±0,50 | 7,20±0,40  |
| Глу               | 10,0±0,45     | 14,43±0,48 | 12,23±0,50 | 16,1±0,45 | 8,5±0,30  | 8,40±0,50 | 9,50±0,48 | 10,0±0,50  |
| Тре               | 3,37±0,45     | 6,19±0,20  | 5,96±0,18  | 5,03±0,25 | 3,5±0,32  | 4,50±0,22 | 4,80±0,35 | 5,0 ±0,28  |
| Ала               | 6,71±0,50     | 6,15±0,40  | 6,63±0,20  | 6,40±0,32 | 6,4±0,48  | 6,20±0,50 | 5,60±0,40 | 6,0 ±0,20  |
| Тир               | 5,24±0,50     | 5,94±0,50  | 6,14±0,30  | 6,28±0,28 | 5,6±0,45  | 6,00±0,38 | 5,00±0,32 | 5,30±0,34  |
| Вал+Мет           | 8,74±0,45     | 7,90±0,32  | 8,4 ±0,30  | 8,15±0,41 | 8,1±0,28  | 8,00±0,42 | 8,00±0,30 | 7,40±0,45  |
| Фен               | 7,60±0,32     | 7,79±0,48  | 9,47±0,42  | 7,82±0,50 | 8,0±0,15  | 7,70±0,35 | 7,80±0,25 | 7,20±0,30  |
| Лей+Іле           | 12,72±0,50    | 12,89±0,50 | 9,76±0,50  | 9,80±0,50 | 10,0±0,35 | 9,50±0,48 | 8,50±0,50 | 10,20±0,50 |

\* - головні фракції гемоглобінів.

Таблиця 8

Кількісний вміст амінокислот в електрофоретично гомогенних фракціях  
гемоглобінів окремих представників класу птахів (мкг на 100 мкг  
гідролізату білка, n = 11-15)

| Амінокис-<br>лоти | Голуб           | Качки      |           |            |            | Кури       |            |            |
|-------------------|-----------------|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|
|                   | одна<br>фракція | жк<br>Нв-1 | ж<br>Нв-2 | Нв-3       | Нв-4       | жк<br>Нв-1 | ж<br>Нв-2  | Нв-3       |
| Цис               | 3,20±0,25       | 2,90±0,30  | 2,90±0,30 | 3,0±0,30   | 2,50±0,30  | 2,70±0,35  | 3,0±0,20   | 2,50±0,15  |
| Ліз               | 9,20±0,40       | 5,70±0,40  | 4,40±0,50 | 8,70±0,20  | 5,40±0,20  | 8,60±0,20  | 6,80±0,20  | 8,50±0,25  |
| Гіс               | 7,20±0,30       | 5,10±0,20  | 6,0 ±0,40 | 2,70±0,20  | 3,0±0,30   | 5,50±0,34  | 6,20±0,40  | 6,30±0,50  |
| Арг               | 5,0 ±0,40       | 7,30±0,40  | 7,40±0,40 | 2,0±0,30   | 2,80±0,20  | 7,40±0,28  | 7,10±0,30  | 5,20±0,20  |
| Асп               | 12,0±0,25       | 10,0±0,50  | 7,60±0,50 | 11,30±0,30 | 13,50±0,50 | 8,0±0,15   | 10,30±0,28 | 10,50±0,30 |
| Сер               | 5,50±0,50       | 6,40±0,30  | 9,70±0,30 | 5,20±0,40  | 11,40±0,40 | 6,20±0,25  | 5,10±0,20  | 5,80±0,28  |
| Глі               | 4,90±0,20       | 10,0±0,50  | 11,6±0,50 | 7,70±0,30  | 9,0±0,50   | 5,0±0,45   | 4,90±0,40  | 5,10±0,40  |
| Глу               | 10,3±0,40       | 10,4±0,40  | 13,8±0,50 | 6,0 ±0,50  | 6,0±0,50   | 7,5±0,28   | 9,60±0,20  | 11,8±0,35  |
| Тре               | 5,50±0,35       | 6,0±0,50   | 5,80±0,40 | 9,0 ±0,30  | 6,0±0,40   | 5,5±0,40   | 5,0±0,45   | 6,10±0,42  |
| Ала               | 6,0 ±0,50       | 5,0±0,20   | 5,0 ±0,30 | 5,4 ±0,50  | 5,0±0,30   | 7,8±0,25   | 9,0±0,20   | 8,70±0,18  |
| Тир               | 4,50±0,28       | 5,6±0,40   | 6,90±0,50 | 5,70±0,50  | 6,9±0,50   | 4,5±0,45   | 3,9±0,50   | 4,10±0,50  |
| Вал+Мет           | 7,90±0,35       | 11,3±0,40  | 9,70±0,30 | 10,3±0,30  | 9,6±0,50   | 8,0±0,38   | 8,2±0,25   | 6,90±0,28  |
| Фен               | 6,50±0,40       | 10,9±0,50  | 8,90±0,20 | 14,7±0,50  | 7,2±0,30   | 7,5±0,20   | 7,1±0,45   | 6,0 ±0,40  |
| Лей+Іло           | 14,0±0,50       | 11,8±0,20  | 14,4±0,50 | 13,2±0,50  | 14,6±0,50  | 14,6±0,50  | 14,0±0,48  | 14,50±0,50 |

ж - фракції з найбільшим вмістом білка

Таблиця 9

Кількісний вміст амінокислот в електрофоретично гомогенних фракціях  
гемоглобінів окремих представників класу ссавців (мкг на 100 мкг  
гідролізату білка; n = 11-15)

| Аміно-<br>кислоти | Людина                    |                           |                           | Бик                        |                            |                           | Свиня                     |                           |                            | Тюлень                     |                           |                           |                           |      |
|-------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|------|
|                   | Нв-1                      | Нв-2*                     | Нв-3                      | Нв-1                       | Нв-2*                      | Нв-3                      | Нв-1                      | Нв-2*                     | Нв-3                       | Нв-1                       | Нв-2                      | Нв-3                      | Нв-4*                     | Нв-5 |
| I                 | 2                         | 3                         | 4                         | 5                          | 6                          | 7                         | 8                         | 9                         | 10                         | 11                         | 12                        | 13                        | 14                        |      |
| Цис               | 2,80 <sup>±</sup><br>0,20 | 2,43 <sup>±</sup><br>0,20 | 2,43 <sup>±</sup><br>0,30 | 2,50 <sup>±</sup><br>0,38  | 2,48 <sup>±</sup><br>0,40  | 2,80 <sup>±</sup><br>0,50 | 2,80 <sup>±</sup><br>0,35 | 2,80 <sup>±</sup><br>0,48 | 2,34 <sup>±</sup><br>0,40  | 2,60 <sup>±</sup><br>0,45  | 2,60 <sup>±</sup><br>0,50 | 2,50 <sup>±</sup><br>0,30 | 2,30 <sup>±</sup><br>0,32 | 28   |
| Ліз               | 10,5 <sup>±</sup><br>0,45 | 10,0 <sup>±</sup><br>0,50 | 10,0 <sup>±</sup><br>0,48 | 10,75 <sup>±</sup><br>0,40 | 9,8 <sup>±</sup><br>0,30   | 12,3 <sup>±</sup><br>0,30 | 10,6 <sup>±</sup><br>0,30 | 8,50 <sup>±</sup><br>0,30 | 10,42 <sup>±</sup><br>0,28 | 7,20 <sup>±</sup><br>0,30  | 6,95 <sup>±</sup><br>0,45 | 5,93 <sup>±</sup><br>0,40 | 6,45 <sup>±</sup><br>0,45 | 75   |
| Гіс               | 10,7 <sup>±</sup><br>0,30 | 9,20 <sup>±</sup><br>0,20 | 8,20 <sup>±</sup><br>0,35 | 7,80 <sup>±</sup><br>0,20  | 8,0 <sup>±</sup><br>0,30   | 10,0 <sup>±</sup><br>0,40 | 7,70 <sup>±</sup><br>0,25 | 6,0 <sup>±</sup><br>0,40  | 5,60 <sup>±</sup><br>0,30  | 6,40 <sup>±</sup><br>0,50  | 6,37 <sup>±</sup><br>0,50 | 3,92 <sup>±</sup><br>0,30 | 4,54 <sup>±</sup><br>0,35 | 9    |
| Арг               | 3,26 <sup>±</sup><br>0,20 | 3,26 <sup>±</sup><br>0,20 | 3,80 <sup>±</sup><br>0,10 | 5,0 <sup>±</sup><br>0,50   | 4,30 <sup>±</sup><br>0,50  | 3,0 <sup>±</sup><br>0,20  | 5,40 <sup>±</sup><br>0,25 | 5,70 <sup>±</sup><br>0,20 | 4,30 <sup>±</sup><br>0,50  | 3,10 <sup>±</sup><br>0,40  | 3,15 <sup>±</sup><br>0,40 | 3,20 <sup>±</sup><br>0,45 | 3,20 <sup>±</sup><br>0,30 |      |
| Асп               | 10,4 <sup>±</sup><br>0,40 | 10,4 <sup>±</sup><br>0,40 | 11,2 <sup>±</sup><br>0,40 | 8,5 <sup>±</sup><br>0,30   | 10,90 <sup>±</sup><br>0,20 | 8,40 <sup>±</sup><br>0,20 | 11,5 <sup>±</sup><br>0,30 | 13,7 <sup>±</sup><br>0,20 | 9,10 <sup>±</sup><br>0,40  | 10,98 <sup>±</sup><br>0,50 | 11,6 <sup>±</sup><br>0,50 | 8,67 <sup>±</sup><br>0,40 | 7,90 <sup>±</sup><br>0,50 |      |
| Сер               | 7,20 <sup>±</sup><br>0,30 | 5,30 <sup>±</sup><br>0,20 | 5,60 <sup>±</sup><br>0,30 | 7,20 <sup>±</sup><br>0,30  | 5,50 <sup>±</sup><br>0,28  | 8,0 <sup>±</sup><br>0,40  | 9,95 <sup>±</sup><br>0,40 | 9,50 <sup>±</sup><br>0,30 | 6,20 <sup>±</sup><br>0,35  | 5,90 <sup>±</sup><br>0,50  | 5,50 <sup>±</sup><br>0,45 | 7,90 <sup>±</sup><br>0,48 | 8,40 <sup>±</sup><br>0,50 |      |
| Глі               | 4,70 <sup>±</sup><br>0,30 | 4,70 <sup>±</sup><br>0,20 | 4,70 <sup>±</sup><br>0,30 | 5,40 <sup>±</sup><br>0,40  | 4,90 <sup>±</sup><br>0,50  | 7,20 <sup>±</sup><br>0,20 | 5,40 <sup>±</sup><br>0,30 | 5,50 <sup>±</sup><br>0,25 | 7,50 <sup>±</sup><br>0,30  | 7,30 <sup>±</sup><br>0,30  | 7,85 <sup>±</sup><br>0,20 | 9,54 <sup>±</sup><br>0,25 | 7,80 <sup>±</sup><br>0,50 |      |

| 1       | 2                        | 3                        | 4                        | 5                        | 6                        | 7                         | 8                        | 9                        | 10                       | 11                       | 12                       | 13                        | 14                       |
|---------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Глу     | 7,8 <sup>±</sup><br>0,4  | 7,3 <sup>±</sup><br>0,35 | 7,8 <sup>±</sup><br>0,4  | 8,7 <sup>±</sup><br>0,4  | 8,8 <sup>±</sup><br>0,45 | 10,5 <sup>±</sup><br>0,4  | 8,6 <sup>±</sup><br>0,5  | 8,3 <sup>±</sup><br>0,4  | 7,22 <sup>±</sup><br>0,3 | 7,17 <sup>±</sup><br>0,3 | 9,62 <sup>±</sup><br>0,5 | 9,8 <sup>±</sup><br>0,4   | 13,4 <sup>±</sup><br>0,3 |
| Тре     | 7,1 <sup>±</sup><br>0,3  | 5,95 <sup>±</sup><br>0,2 | 5,2 <sup>±</sup><br>0,3  | 5,5 <sup>±</sup><br>0,2  | 6,7 <sup>±</sup><br>0,4  | 9,4 <sup>±</sup><br>0,5   | 9,0 <sup>±</sup><br>0,5  | 5,6 <sup>±</sup><br>0,5  | 5,1 <sup>±</sup><br>0,45 | 4,75 <sup>±</sup><br>0,4 | 3,7 <sup>±</sup><br>0,3  | 3,7 <sup>±</sup><br>0,3   | 4,9 <sup>±</sup><br>0,4  |
| Ала     | 8,9 <sup>±</sup><br>0,2  | 10,0 <sup>±</sup><br>0,2 | 10,0 <sup>±</sup><br>0,2 | 9,0 <sup>±</sup><br>0,4  | 8,5 <sup>±</sup><br>0,4  | 7,5 <sup>±</sup><br>0,45  | 9,1 <sup>±</sup><br>0,5  | 7,8 <sup>±</sup><br>0,4  | 7,5 <sup>±</sup><br>0,5  | 7,3 <sup>±</sup><br>0,3  | 9,34 <sup>±</sup><br>0,2 | 10,2 <sup>±</sup><br>0,3  | 7,2 <sup>±</sup><br>0,2  |
| Тир     | 2,8 <sup>±</sup><br>0,5  | 3,4 <sup>±</sup><br>0,3  | 3,4 <sup>±</sup><br>0,4  | 4,3 <sup>±</sup><br>0,4  | 3,9 <sup>±</sup><br>0,45 | 4,5 <sup>±</sup><br>0,4   | 4,2 <sup>±</sup><br>0,4  | 5,0 <sup>±</sup><br>0,3  | 4,8 <sup>±</sup><br>0,3  | 4,9 <sup>±</sup><br>0,5  | 5,4 <sup>±</sup><br>0,5  | 4,4 <sup>±</sup><br>0,4   | 5,4 <sup>±</sup><br>0,4  |
| Вал+Мет | 12,5 <sup>±</sup><br>0,2 | 14,0 <sup>±</sup><br>0,2 | 14,0 <sup>±</sup><br>0,2 | 9,2 <sup>±</sup><br>0,3  | 9,8 <sup>±</sup><br>0,4  | 10,85 <sup>±</sup><br>0,4 | 8,5 <sup>±</sup><br>0,4  | 9,0 <sup>±</sup><br>0,4  | 8,7 <sup>±</sup><br>0,4  | 7,8 <sup>±</sup><br>0,3  | 9,85 <sup>±</sup><br>0,3 | 9,97 <sup>±</sup><br>0,45 | 9,98 <sup>±</sup><br>0,5 |
| Фен     | 7,75 <sup>±</sup><br>0,2 | 7,8 <sup>±</sup><br>0,3  | 7,75 <sup>±</sup><br>0,2 | 7,5 <sup>±</sup><br>0,4  | 7,7 <sup>±</sup><br>0,4  | 7,0 <sup>±</sup><br>0,5   | 8,0 <sup>±</sup><br>0,5  | 7,5 <sup>±</sup><br>0,4  | 7,9 <sup>±</sup><br>0,3  | 7,9 <sup>±</sup><br>0,5  | 8,6 <sup>±</sup><br>0,5  | 10,0 <sup>±</sup><br>0,5  | 7,7 <sup>±</sup><br>0,3  |
| Лей+Іле | 16,0 <sup>±</sup><br>0,5 | 14,7 <sup>±</sup><br>0,4 | 15,0 <sup>±</sup><br>0,5 | 14,0 <sup>±</sup><br>0,3 | 14,2 <sup>±</sup><br>0,5 | 13,0 <sup>±</sup><br>0,5  | 14,5 <sup>±</sup><br>0,5 | 13,4 <sup>±</sup><br>0,5 | 11,4 <sup>±</sup><br>0,5 | 12,6 <sup>±</sup><br>0,4 | 10,8 <sup>±</sup><br>0,4 | 11,2 <sup>±</sup><br>0,5  | 10,7 <sup>±</sup><br>0,4 |

\* - головні фракції гемоглобінів.

Таблиця ІО

Рівень варіабельності амінокислот  
в гемоглобінах окремих представників  
хребетних

| Амінокислоти             | Цис  | Ліз  | Гіс  | Арг         | Асп  | Сер         | Глі  | Глу  |
|--------------------------|------|------|------|-------------|------|-------------|------|------|
| Індекс варіабельності, % | 55,0 | 67,6 | 74,8 | 73,0        | 52,6 | 54,8        | 72,8 | 62,7 |
| Амінокислота             | Тре  | Ала  | Тир  | Вал+<br>Мет | Фен  | Лей+<br>Іле |      |      |
| Індекс варіабельності, % | 70,5 | 50,0 | 59,4 | 43,6        | 61,2 | 41,7        |      |      |

ряду хребетних від риб до плазунів, а також загальний вміст дикарбонових та основних амінокислот /табл. II/.

На рис. 7 дана графічна оцінка змін у співвідношенні дикарбонових і основних амінокислот в електрофоретично гомогенних фракціях гемоглобінів, де можна виділити ділянки з найбільшим інтервалом в значеннях величини ДС/В: при переході від класу круглоротих до класу риб, а також від класу риб до класу земноводних та від плазунів до класу ссавців. В характері змін показника ДС/В фракцій тетрамерних гемоглобінів можна відмітити певну спрямованість: зниження величини ДС/В при переході від класу риб до класу ссавців. Показник ДС/В гемоглобінів у представників класу птахів практично знаходиться на тому ж рівні, що й у плазунів.

Виявляється певний взаємозв'язок в змінах показника ДС/В і спорідненості фракцій гемоглобінів до кисню. В характері змін структурного і функціонального  $P_{50}$  показників гемоглобінів просліджується обернена залежність, котра зберігається в напрямку від риб до ссавців /рис.8;  $r = 0,84$ /.

На рисунку В можна також відмітити, що ступень змін як спорідненості до кисню, так і співвідношення дикарбонових і основних амінокислот в головних фракціях гемоглобінів зникається при переході від більш низьких філогенетичних груп хребетних до більш вищих. Ці дані дозволяють зробити припущення про те, що зміни в хімічній структурі гемоглобінів в процесі філогенезу відбувалися нерівномірно і найбільш істотні з

Таблиця II

Показники гідрофобності нр/р (співвідношення гідрофобних і полярних амінокислот) і dc/в (співвідношення дикарбонових і основних амінокислот) електрофоретично гомогенних фракцій гемоглобінів окремих представників хребетних

| Показ-<br>ники | Людина |       |      | Бик  |       |      | Свиня |       |      | Тюлень |      |      |       |      | Голуб        |
|----------------|--------|-------|------|------|-------|------|-------|-------|------|--------|------|------|-------|------|--------------|
|                | Нв-1   | Нв-2* | Нв-3 | Нв-1 | Нв-2* | Нв-3 | Нв-1  | Нв-2* | Нв-3 | Нв-1   | Нв-2 | Нв-3 | Нв-4* | Нв-5 | одна фракція |
| нр/р           | 0,74   | 0,85  | 0,85 | 0,72 | 0,72  | 0,60 | 0,63  | 0,65  | 0,69 | 0,73   | 0,77 | 0,83 | 0,69  |      | 0,62         |
| до/в           | 0,74   | 0,79  | 0,86 | 0,73 | 0,89  | 0,75 | 0,85  | 1,09  | 0,80 | 1,09   | 1,29 | 1,4  | 1,5   |      | 1,04         |

| Показ-<br>ники | Качки |      |      |      | Кури  |      |      | Вуж   |      | Черепаха |      | Жаба трав. |      | Жаба сіра |      |
|----------------|-------|------|------|------|-------|------|------|-------|------|----------|------|------------|------|-----------|------|
|                | Нв-1* | Нв-2 | Нв-3 | Нв-4 | Нв-1* | Нв-2 | Нв-3 | Нв-1* | Нв-2 | Нв-1*    | Нв-2 | Нв-1*      | Нв-2 | Нв-1*     | Нв-2 |
| нр/р           | 0,70  | 0,65 | 0,89 | 0,72 | 0,75  | 0,73 | 0,65 | 0,59  | 0,58 | 0,57     | 0,60 | 0,61       | 0,60 | 0,64      | 0,62 |
| до/в           | 1,1   | 1,2  | 1,3  | 1,6  | 0,72  | 0,99 | 1,1  | 0,96  | 1,13 | 0,95     | 1,16 | 1,15       | 1,43 | 1,0       | 1,43 |

| Показ-<br>ники | Короп |       | Товстолоб |       | Скорпена |      |       | Кефаль-сингіль |      |      | Мінога |      |      |
|----------------|-------|-------|-----------|-------|----------|------|-------|----------------|------|------|--------|------|------|
|                | Н-1   | Нв-2* | Нв-1      | Нв-2* | Нв-1     | Нв-2 | Нв-3* | Нв-1*          | Нв-2 | Нв-3 | Нв-1*  | Нв-2 | Нв-3 |
| нр/р           | 0,65  | 0,72  | 0,61      | 0,75  | 0,67     | 0,65 | 0,65  | 0,65           | 0,66 | 0,68 | 0,71   | 0,56 | 0,66 |
| до/в           | 1,47  | 1,96  | 1,34      | 1,90  | 1,36     | 1,5  | 1,90  | 1,31           | 1,55 | 1,90 | 0,93   | 1,06 | 1,32 |

\* - головні фракції гемоглобінів.

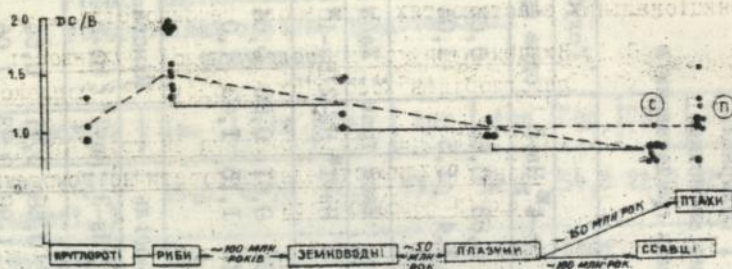


Рис. 7. Філогенетична оцінка змін в співвідношенні дикарбонових і основних амінокислот /ДС/В/ в гемоглобінах хребетних. — — головні фракції, — — мініорні фракції.

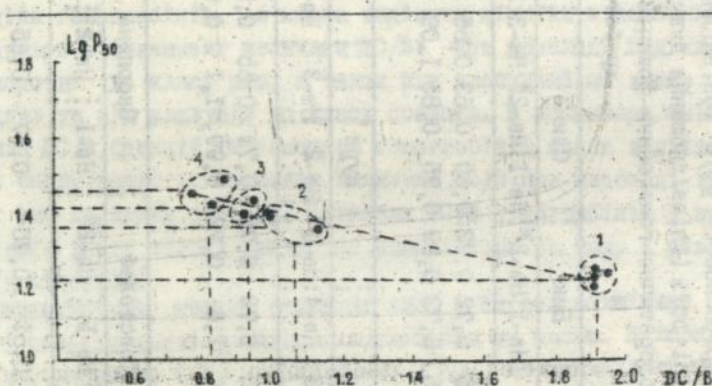


Рис. 8. Кореляційна залежність змін спорідненості до кисню / $P_{50}$ / і співвідношення дикарбонових і основних амінокислот /ДС/В/ для головних фракцій гемоглобінів представників класу риб /1/, земноводних /2/, плазунів /3/ і ссавців /4/.

них могли стати причиною змін в фізико-хімічних / відносна електрофоретична рухомість фракцій, рІ ізоелектричних компонентів / і функціональних властивостях дихального гемопротеїду.

## 2.2. Вивчення внутрішньомолекулярної рухливості гемоглобінів хребетних методом ЯМР - релаксації

### 2.2.1. Порівняльна характеристика внутрішньомолекулярної рухливості електрофоретично гомогенних фракцій гемоглобінів

Вивчення процесів спин-спінової релаксації в протонних системах фракцій гемоглобінів дозволило в певній мірі оцінити рівень їх внутрішньомолекулярної рухливості. Процеси спин-спінової релаксації вивчали одноімпульсовою методикою за спадом вільної індукції та за допомогою багатоімпульсної послідовності, за спадом амплітуди спінового еха. В якості зразка на рис.9 приведені криві спаду вільної індукції фракцій гемоглобіну людини.

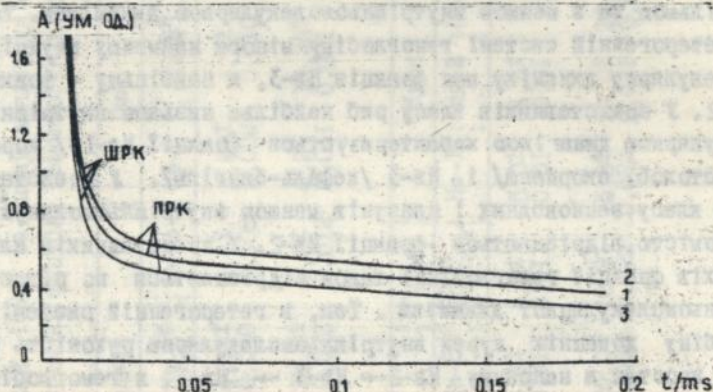


Рис. 9. Криві спаду вільної індукції фракцій гемоглобіну людини. ШРК - швидкорелаксуючий компонент, ПРК - повільнорелаксуючий компонент / цифрами позначені номери фракцій /.

На підставі даних літератури /Аксенов, 1983; Іванітков, Абрамов, Волков, Зав'язлов, 1983/ можна відмітити: одержані значення часів релаксації свідчать про те, що швидкорелаксуючий компонент спада вільної індукції відповідає релаксації протонів найбільш щільно упакованих і малорухливих ділянок глобули. В зв'язку з цим, час релаксації ШРК спаду вільної індукції може

бути використаний як параметр внутрішньомолекулярної рухливості в білку, що несе інформацію про динамічну структуру найменш лабільних ділянок макромолекули гемоглобіну. Аналіз часів релаксації компонент спаду амплітуди спінового еха дозволяє віднести ШРК до релаксації найбільш рухомих ділянок глобули білка, тоді як повільнорелаксуючий компонент - до релаксації протонів води, що входять в розчинник  $D_2O$  внаслідок водневого обміну. Тому в якості показника інтенсивності внутрішньомолекулярної динаміки в найбільш рухливих ділянках білкової глобули може бути використаний час релаксації ШРК.

В табл. I2 подані значення часів релаксації ШРК спаду вільної індукції і спаду амплітуди спінового еха, які одержані методом ЯМР-релаксації для електрофоретично гомогенних фракцій досліджуваних гемоглобінів.

Порівняльний аналіз часів релаксації дав можливість встановити, що в кожній гетерогенній системі гемоглобіну є фракції з більшою та з меншою внутрішньомолекулярною динамікою. Так, в гетерогенній системі гемоглобіну міноги найменшу внутрішньомолекулярну динаміку має фракція Нв-3, а найбільшу - фракція Нв-2. У представників класу риб найбільш низькою внутрішньомолекулярною динамікою характеризується фракція Нв-1 / короп, товстолоб, скорпена / і Нв-3 / кефаль-сингіль /. У представників класу земноводних і плазунів меншою внутрішньомолекулярною рухомістю відрізняються фракції Нв-2. У представників класу птахів фракції гемоглобінів також відрізняються по рівню внутрішньомолекулярної динаміки. Так, в гетерогенній системі гемоглобіну домашніх курей внутрішньомолекулярна рухомість фракцій зростає в напрямку Нв-2 → Нв-3 → Нв-1, в гемоглобіні домашніх качок - в напрямку Нв-4 → Нв-1 → Нв-2 → Нв-3. Показники внутрішньомолекулярної рухомості гемоглобіну голуба близькі до відповідних показників фракцій Нв-1 гемоглобінів домашніх курей та качок.

Спостерігається різний рівень внутрішньомолекулярної рухомості фракцій гемоглобінів у представників класу ссавців. В гетерогенній системі гемоглобіну людини внутрішньомолекулярна динаміка фракцій зростає в напрямку Нв-3 → Нв-1 → Нв-2. Така ж спрямованість прослідковується для гемоглобіну свині. У бика меншим рівнем внутрішньомолекулярної динаміки гемоглобіну характеризуються фракція Нв-1. В гемоглобіні гренландського тю-

Таблиця 12

Значення часів релаксації ( $T_2$ ) швидкорелаксуючого компонента (ШРК) спаду вільної індукції (СВІ) та спаду амплітуди спінового еха (САСЕ) для електрофоретично гомогенних фракцій гемоглобінів окремих представників хребетних

| Показники                        | Людина           |                  |                 | Бик              |                   | Свиня           |                 |                 | Тюлень           |                  |                  |
|----------------------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|
|                                  | Нв-1             | Нв-2*            | Нв-3            | Нв-1             | Нв-2*             | Нв-1            | Нв-2*           | Нв-3            | Нв-1             | Нв-2             | Нв-3             |
| $T_2$ ШРК (СВІ),<br>$10^{-3}$ мс | $4,0 \pm 0,008$  | $4,75 \pm 0,010$ | $3,6 \pm 0,008$ | $3,65 \pm 0,008$ | $4,7 \pm 0,010$   | $4,3 \pm 0,008$ | $4,6 \pm 0,009$ | $3,7 \pm 0,009$ | $6,6 \pm 0,01$   | $6,4 \pm 0,01$   | $4,8 \pm 0,008$  |
| $T_2$ ШРК (САСЕ),<br>мс          | $10,0 \pm 0,021$ | $13,2 \pm 0,022$ | $8,0 \pm 0,012$ | $8,2 \pm 0,011$  | $13,35 \pm 0,021$ | $11,4 \pm 0,02$ | $12,8 \pm 0,02$ | $9,0 \pm 0,011$ | $18,5 \pm 0,024$ | $18,0 \pm 0,024$ | $14,6 \pm 0,022$ |

| Показники                        | Голуб            |                  | Кури             |                  |                  | Качки            |                  |                  |                  |                 |
|----------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|
|                                  | Нв-4*            | Нв-5             | одна фракція     | Нв-1*            | Нв-2             | Нв-3             | Нв-1*            | Нв-2             | Нв-3             | Нв-4            |
| $T_2$ ШРК (СВІ),<br>$10^{-3}$ мс | $4,4 \pm 0,008$  | $6,9 \pm 0,012$  | $5,8 \pm 0,011$  | $5,0 \pm 0,01$   | $4,5 \pm 0,01$   | $4,8 \pm 0,009$  | $6,2 \pm 0,01$   | $6,25 \pm 0,011$ | $7,3 \pm 0,012$  | $4,7 \pm 0,009$ |
| $T_2$ ШРК (САСЕ),<br>мс          | $11,2 \pm 0,021$ | $20,0 \pm 0,025$ | $16,2 \pm 0,022$ | $15,8 \pm 0,022$ | $13,0 \pm 0,021$ | $13,8 \pm 0,021$ | $16,5 \pm 0,023$ | $17,0 \pm 0,022$ | $23,3 \pm 0,024$ | $14,0 \pm 0,02$ |

| Показники                                        | Вуж                       |                            | Черепаша                   |                            | Жаба трав.                 |                           | Жаба сіра                 |                            | Короп                     |                            |
|--------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
|                                                  | Нв-І*                     | Нв-2                       | Нв-І*                      | Нв-2                       | Нв-І*                      | Нв-2                      | Нв-І*                     | Нв-2                       | Нв-І                      | Нв-2*                      |
| T <sub>2</sub> ШРК (СВІ),<br>10 <sup>-3</sup> мс | 4,8 <sup>±</sup><br>0,009 | 4,49 <sup>±</sup><br>0,009 | 4,55 <sup>±</sup><br>0,009 | 4,3 <sup>±</sup><br>0,008  | 4,4 <sup>±</sup><br>0,009  | 3,5 <sup>±</sup><br>0,009 | 4,6 <sup>±</sup><br>0,008 | 4,15 <sup>±</sup><br>0,008 | 3,0 <sup>±</sup><br>0,007 | 3,5 <sup>±</sup><br>0,007  |
| T <sub>2</sub> ШРК (CACE),<br>мс                 | 14,0 <sup>±</sup><br>0,02 | 11,8 <sup>±</sup><br>0,022 | 12,8 <sup>±</sup><br>0,019 | 11,1 <sup>±</sup><br>0,018 | 11,0 <sup>±</sup><br>0,018 | 8,4 <sup>±</sup><br>0,012 | 13,0 <sup>±</sup><br>0,02 | 10,0 <sup>±</sup><br>0,02  | 5,5 <sup>±</sup><br>0,01  | 7,95 <sup>±</sup><br>0,012 |

| Показники                                        | Товстолоб                  |                            | Скорпена                  |                           |                           | Кефаль-сингіль            |                           |                           | Мінога                    |                           |                           |
|--------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                                                  | Нв-І                       | Нв-2*                      | Нв-І                      | Нв-2                      | Нв-3*                     | Нв-І*                     | Нв-2                      | Нв-3                      | Нв-І*                     | Нв-2                      | Нв-3                      |
| T <sub>2</sub> ШРК (СВІ),<br>10 <sup>-3</sup> мс | 3,15 <sup>±</sup><br>0,007 | 3,7 <sup>±</sup><br>0,008  | 3,1 <sup>±</sup><br>0,007 | 3,6 <sup>±</sup><br>0,008 | 3,3 <sup>±</sup><br>0,008 | 4,0 <sup>±</sup><br>0,008 | 3,6 <sup>±</sup><br>0,008 | 3,3 <sup>±</sup><br>0,007 | 2,5 <sup>±</sup><br>0,006 | 3,0 <sup>±</sup><br>0,008 | 2,1 <sup>±</sup><br>0,008 |
| T <sub>2</sub> ШРК (CACE),<br>мс                 | 5,87 <sup>±</sup><br>0,012 | 8,45 <sup>±</sup><br>0,015 | 6,0 <sup>±</sup><br>0,011 | 8,0 <sup>±</sup><br>0,013 | 7,0 <sup>±</sup><br>0,011 | 10,0 <sup>±</sup><br>0,02 | 9,3 <sup>±</sup><br>0,018 | 6,5 <sup>±</sup><br>0,011 | 6,1 <sup>±</sup><br>0,012 | 8,2 <sup>±</sup><br>0,015 | 4,5 <sup>±</sup><br>0,009 |

\* - фракції з найбільш високим вмістом білка.

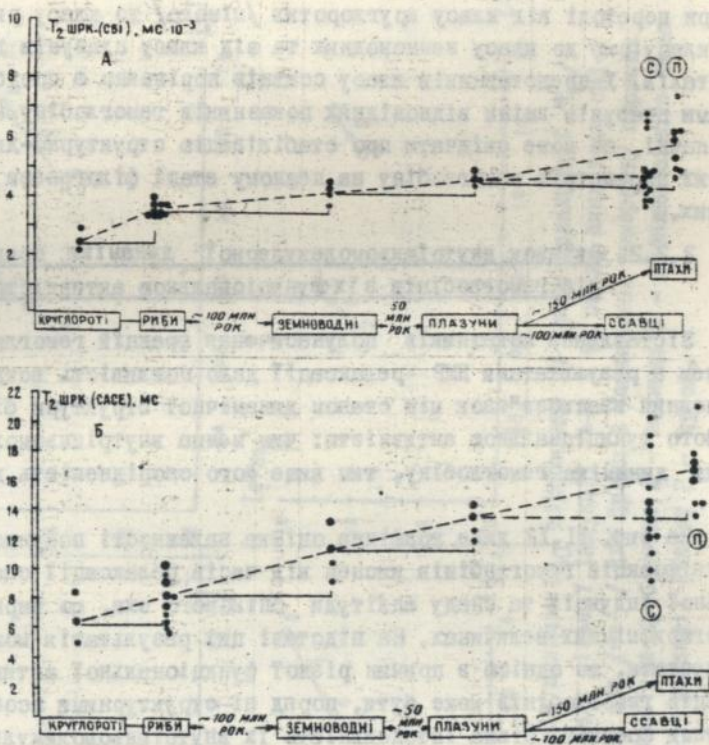


Рис. 10. Філогенетична оцінка часів релаксації  $T_2$  ШРК спаду вільної індукції /А/ та спаду амплітуди спінового еха /Б/ електрофоретично гомогенних фракцій гемоглобінів хребетних; • - головні фракції, • - мінорні фракції.

лення найбільш високим рівнем внутрішньомолекулярної динаміки відрізняється фракція Нв-5, потім в напрямку обмеження внутрішньомолекулярної рухомості йдуть фракції Нв-І, Нв-2, Нв-3 і Нв-4 /головна /. На рисунку 10 дана графічна оцінка філогенетичних відмін часів релаксації ШРК спаду вільної індукції та спаду амплітуди спінового еха електрофоретично гомогенних фракцій досліджуваних гемоглобінів хребетних. Ці дані вказують

на те, що в філогенезі відбувалося закономірне зростання внутрішньомолекулярної рухомості гемоглобіну. Найбільш значні відмінності внутрішньомолекулярної динаміки гемоглобіну просліджується при переході від класу круглоротих /мінога/ до класу риб, від класу риб до класу земноводних та від класу плазунів до класу птахів. У представників класу ссавців порівняно з представниками плазунів зміни відповідних показників гемоглобіну не такі значні, що може свідчати про стабілізацію структурно-динамічних параметрів гемоглобіну на певному етапі філогенеза хребетних.

## 2.2.2. Зв'язок внутрішньомолекулярної динаміки фракцій гемоглобінів з їх функціональною активністю

Зіставлення показників полунасичення фракцій гемоглобінів киснем з результатами ЯМР-релаксації дало можливість встановити певний взаємозв'язок між станом динамічної структури білка та його функціональною активністю: чим менша внутрішньомолекулярна динаміка гемоглобіну, тим вище його спорідненість до кисню.

На рис. II,12 дана графічна оцінка залежності полунасичення фракцій гемоглобінів киснем від часів релаксації спаду вільної індукції та спаду амплітуди спінового еха, що виражено в логарифмічних величинах. На підставі цих результатів можна припустити, що однією з причин різної функціональної активності фракцій гемоглобінів може бути, поряд зі структурними особливостями фракцій, різна інтенсивність їх внутрішньомолекулярної рухомості. Очевидно, чим вона нижче, тим повільніше здійснюється  $R \rightarrow T$ -конформаційний перехід при дезоксигенації гемоглобіну. Відповідно, гемоглобіни з більш обмеженою внутрішньомолекулярною динамікою будуть мати більш високу спорідненість до кисню. Така закономірність просліджується в гетерогенних системах всіх досліджуваних гемоглобінів.

Порівняльний аналіз одержаних даних дозволив встановити певну відповідність у філогенетичних особливостях внутрішньомолекулярної рухомості фракцій гемоглобінів та їх спорідненості до кисню. Просліджується пряма кореляційна залежність в характері змін показника полунасичення фракцій гемоглобінів киснем і внутрішньомолекулярної рухомості фракцій. Коефіцієнт кореляції  $r = +0,9$  / $p > 98\%$ ).

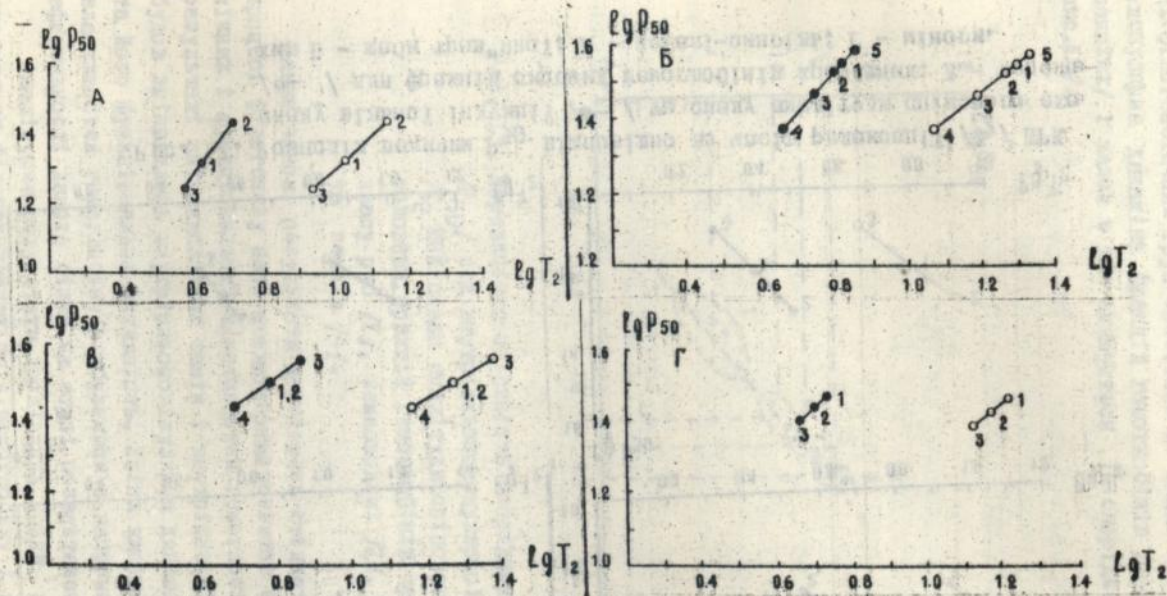


Рис. II. Розподіл величин  $P_{50}$  відповідно до часів релаксації  $T_2$  / ШРК спаду вільної індукції /●— / та спаду амплітуди спінового еха /○— / для фракцій /позначені номерами/ окремих гемоглобінів хребетних: А — людини; Б — гренландського тюленя; В — домашніх качок; Г — курей.

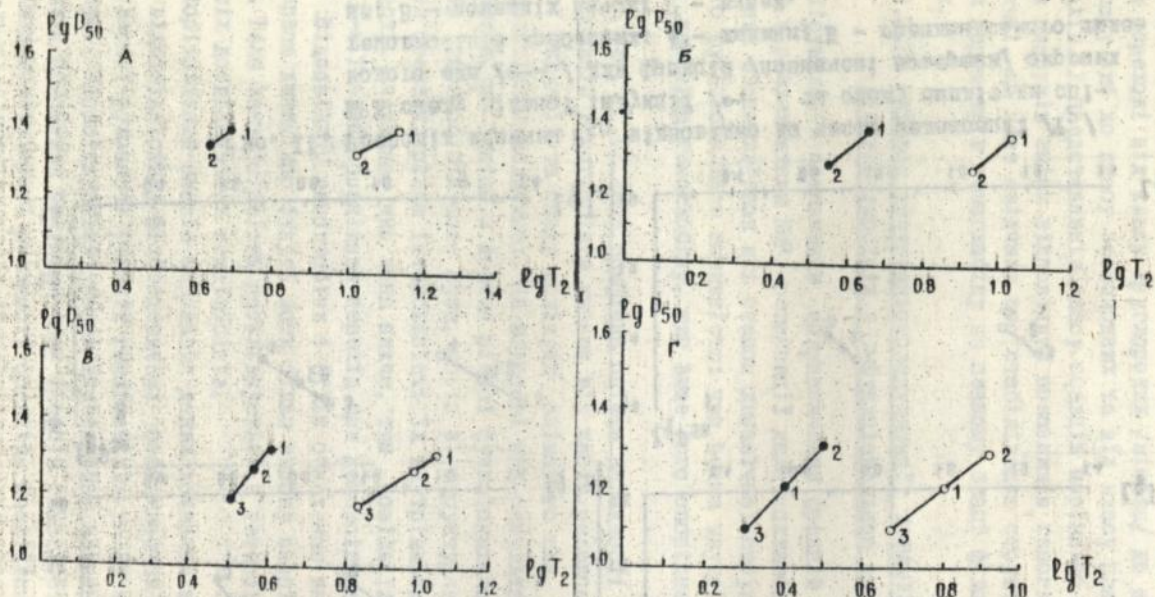


Рис. 12. Розподіл величин  $P_{50}$  відповідно до часів релаксації  $T_2$  / ШРК спаду вільної індукції /●—/ та спаду амплітуди спінового еха /○—/ для фракцій окремих гемоглобінів хребетних: А - черепахи; Б - жаби трав'яної; В - кефалі-сингіль; Г - міноги.

Суть цієї залежності полягає в тому, що при переході від нижчих філогенетичних груп хребетних до вищих зростає внутрішньомолекулярна динаміка фракцій гемоглобінів /зокрема, в головних фракціях/ і разом з тим знижується їх спорідненість до кисню /рис.13/.

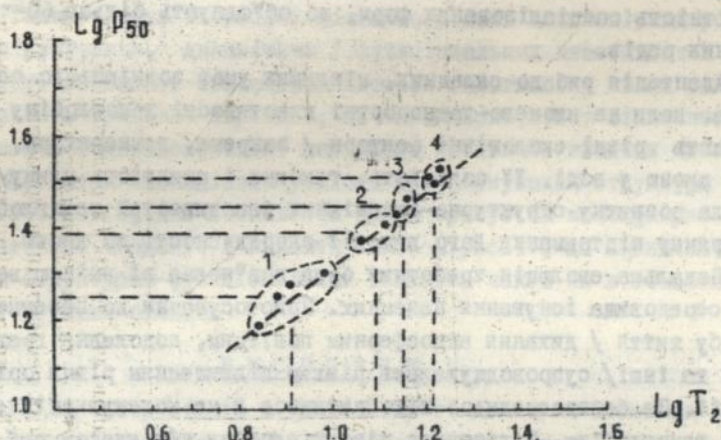


Рис. 13. Кореляційна залежність спорідненості до кисню  $P_{50}$  від внутрішньомолекулярної рухомості  $T_2$  ШРК спада амплітуди спінового еха/ для головних фракцій гемоглобінів представників класу риб /1/, земноводних /2/, плазунів/3/ та птахів /4/.

Таким чином, результати досліджень свідчать про те, що в процесі філогенезу йшов закономірний розвиток структурно-динамічних і функціональних властивостей гемоглобіну. Очевидно, в результаті амінокислотних замін і внутрішньомолекулярних перебудов змінювалась внутрішньомолекулярна динаміка гемоглобіну та його функціональна активність. Зміни киснево-транспортних властивостей гемоглобіну відбувались в напрямку підвищення ефективності даного білка на етапі розвантаження в тканинах.

Аналізуючи результати досліджень можна прослідити певне сполучення філогенетичних змін гемоглобіну і морфофункціональної еволюції хребетних. В результаті класичних порівняльно-

анатомічних, онтогенетичних і палеонтологічних досліджень відомі основні напрямки і шляхи еволюції хребетних / *Carlson*, 1986/. Вихідною предковою формою хребетних рахуються давні безщелепні, від яких виникли примітивні безщелепні, що дали початок давнім риbam. Подальша еволюція привела до появи хрящових і кісткових риб, які активно заселяли водні біоценози й дали велику різноманітність спеціалізованих форм, що об'єднують більше 60-ти сучасних рядів.

Адаптація риб до складних, мінливих умов зовнішнього середовища, коли на киснево-транспортні властивості гемоглобіну впливають різні екологічні фактори / зокрема, температура, вміст кисню у воді, її солоність, глибина і швидкість плину/, сприяла розвитку структурно-динамічних властивостей гемоглобіну в напрямку підтримання його високої спорідненості до кисню.

Подальша еволюція хребетних була пов'язана зі зміною водного середовища існування наземних. Пристосування до наземного способу життя / дихання атмосферним повітрям, подолання гравітації та інші/ супроводжувались різким підвищенням рівня організації. Це безпосередньо відобразилось й на молекулярній еволюції гемоглобіну. Відзначено різкий стрибок між класом риб і класом земноводних з розвитком як структурно-динамічних, так і функціональних властивостей гемоглобіну. Гемоглобін став більш ефективним на етапі розвантаження в тканинах.

Повна незалежність від водного середовища з'явилася у плазунів. Проте, як і земноводні, рептилії мали недовершений метаболізм, що визначалося пойкилотермією, тобто залежністю температури тіла від зовнішніх умов. Такий хід розвитку хребетних вплинув й на структурну організацію молекули гемоглобіну. Розвиток структурно-динамічних і функціональних властивостей гемоглобіну йшов без значних стрибків між класами земноводних і плазунів.

Здатність підтримувати постійну температуру тіла історично склалась незалежно у гоміотермних - птахів і ссавців. У птахів виробився високоефективний механізм дихання, для чого став потрібним досить інтенсивний метаболізм. Це також відобразилось на розвитку гемоглобіну. Стався наступний різкий стрибок з посиленням розвитку структурно-динамічних і функціональних параметрів гемоглобіну в тому ж напрямку, що й у представників попередніх класів.

У ссавців сформувався радикально новий і більш удосконалений тип розмноження - живородіння та вигодування малят. В цій групі хребетних розвиток гемоглобіну мав свої філогенетичні особливості, що проявилися, головним чином, на рівні структурного фактора. Разом з тим мала місце деяка стабілізація динамічних і функціональних параметрів гемоглобіну.

Таким чином, в процесі філогенеза йшов закономірний розвиток структурних, динамічних і функціональних властивостей гемоглобіну. Очевидно, еволюційна історія гемоглобіну являє собою сукупність тривалих періодів, що характеризуються відносною стабільністю і перемішуються періодами порівняно швидких змінювань.

Розвиток еволюційних уявлень про формування структури і функції гемоглобіну дає можливість краще зрозуміти молекулярні основи біологічної еволюції і виявити закономірності, що визначають розвиток структурно-функціональних взаємозв'язків як в гемоглобіні, так і в інших білках.

## ВИСНОВКИ

1. Характер відмін в спорідненості до кисню головних і міnorних електрофоретичних фракцій гемоглобінів у представників різних класів хребетних має видову специфічність і може бути проявом широти норми реакції організму на мінливі умови середовища існування.

2. Встановлено, що в характері змін спорідненості до кисню головних фракцій гемоглобінів просліджується певна закономірність: зниження спорідненості до кисню при переході від більш низьких філогенетичних груп хребетних до більш вищих. Найбільш значні зміни в спорідненості фракцій гемоглобінів до кисню відмічаються при переході від класу риб до класу земноводних, а також від класу плазунів до класу птахів.

3. Показано, що глікозилювання є одним з причин поширення меж гетерогенності гемоглобінів і являє собою універсальний механізм їх модифікаційної мінливості, оскільки спостерігається у всіх групах хребетних, від круглоротих і риб до ссавців.

4. Видова специфічність амінокислотного складу гемоглобінів обумовлена, перш за все, відміними в кількісному вмісті полярних амінокислот. Рівень вмісту гідрофобних амінокислот є більш консервативний. Відсутність значних відмін і закономірностей в кількісному вмісті гідрофобних амінокислот, а також в співвідношенні гідро-

фобних і полярних амінокислот в гемоглобінах при переході від більш низьких філогенетичних груп хребетних до більш вищих дозволяє зробити припущення про те, що основні гідрофобні ділянки молекули гемоглобіну, в тому числі відповідні за стабілізацію і функціонування гема, формувалися на самих ранніх етапах філогенезу.

5. Відміни гемоглобінів в кількісному вмісті більшості гінокислот є різноспрямованими. Спрямовано змінюється вміст Arg та Ser /зростає в напрямку від круглоротих і риб до класу птахів/ та загальний вміст дикарбонових і основних амінокислот. За виключенням гемоглобіну міноги, в характері змін співвідношення дикарбонових і основних амінокислот в складі тетрамерних гемоглобінів у представників інших класів хребетних прослідковується зниження даного показника при ступеневому переході від класу риб до класу ссавців.

6. Встановлена відповідність змін співвідношення дикарбонових і основних амінокислот в головних фракціях гемоглобінів змінам їх спорідненості до кисню. Рівень філогенетичних відмін відповідних структурно-функціональних показників неоднозначний. Найбільш значні зміни відмічаються при переході від класу риб до класу земноводних.

7. Вперше за даними ЯМР-релаксації в протонних системах електрофоретичних фракцій гемоглобінів встановлено, що внутрішньомолекулярна динаміка гемоглобінів характеризується філогенетичними особливостями.

В процесі філогенезу відбувалося закономірне збільшення внутрішньомолекулярної динаміки гемоглобіна. Найбільш значні зміни в рівні внутрішньомолекулярної рухомості гемоглобінів прослідковуються при переході від класу круглоротих до класу риб, від класу риб до класу земноводних та від класу плазунів до класу птахів.

8. Вперше показано, що між станом динамічної структури гемоглобіну та його функціональною активністю прослідковується певний взаємозв'язок: чим менша внутрішньомолекулярна динаміка білка, тим більша його спорідненість до кисню.

9. Встановлена відповідність філогенетичних особливостей внутрішньомолекулярної динаміки гемоглобінів та їх спорідненості до кисню. В процесі філогенезу йшов закономірний розвиток структурно-динамічних і функціональних властивостей гемоглобіну. Відмічені найбільш значні еволюційні стрибки від класу риб до класу

земноводних і від плазунів до класу птахів, а також деяка стабілізація структурно-функціональних параметрів гемоглобіну при переході до класу ссавців.

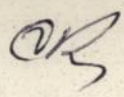
Очевидно, що зміни структурно-динамічних властивостей гемоглобіну та його спорідненості до кисню в процесі філогенезу відбувалися в напрямку, який сприяв більш ефективній віддачі кисню тканинам.

Список робіт, опублікованих по темі дисертації

1. Сухомлинов Б.Ф., Дацків М.З., Коробов В.Н., Демчук В.В., Коношенко С.В., др. Биохимическая эволюция гемоглобина и миоглобина // III Всесоюзный биохим. съезд: Тез.докл., т. I, Рига, 1974. - С. 15.
2. Соркина Д.А., Коношенко С.В. О применении метода гель-фильтрации в тонком слое сефадекса для определения молекулярного веса альбуминов сыворотки крови // Прикладная биохим. и микробиол. - 1975. - т. XI, № 5. - С. 792-797.
3. Коношенко С.В. Аминокислотный состав и сродство к кислороду гемоглобинов домашних уток // Укр.биохим.ж. - 1986. - т. 58, № 5, с. 69-71.
4. Соркина Д.А., Бородин Н.И., Коношенко С.В. Исследование физико-химических свойств и частичной N-концевой аминокислотной последовательности альбумина сыворотки крови кур // Журн. эволюц.биохим. и физиол. - 1978. - т. XIV, № 5, с. 422-427.
5. Коношенко С.В. Ізоелектричні спектри та спорідненість до молекулярного кисню гемоглобінів домашніх качок // Укр. біохім. з'їзд: Тези допов., ч. 2, - Київ, 1987. - С. 14.
6. Коношенко С.В. Аминокислотный состав и сродство к кислороду гемоглобинов кур // Деп. в ВИНТИ, № 1650-79, 1979.
7. Коношенко С.В. К вопросу о структурной гетерогенности гемоглобина морских рыб // Журн. эволюц.биохим. и физиол. - 1987. - т. XXIII, № 3. - С. 41.
8. Соркина Д.А., Коношенко С.В., Ивлев В.Н. Особенности аминокислотного состава альбумина сыворотки крови кур // Журн.эволюц. биохим. и физиол. - 1978. - т. XIV, с. 294-295.

9. Коношенко С.В., Лаура Т.А. Изоэлектрические спектры и пептидные карты главных электрофоретических фракций гемоглобина домашних уток // Укр.биохим.ж. - 1988. - т. 60, № 2. - С. 78-81.
10. Коношенко С.В. Изоэлектрическая гетерогенность гемоглобина домашних уток // Укр.биохим.ж. - 1988. - т. 60, № 5. - С. 72-74.
11. Соркина Д.А., Коношенко С.В., Бородина Н.И. Особенности структуры и физико-химических свойств альбумина сыворотки крови гибридов кур // III Укр.биохим.съезд: Тез.докл., ч. 2, Донецк, 1977. - С. 198-199.
12. Коношенко С.В., Богдасарова Л.А. Возрастные особенности содержания гликозилированного гемоглобина, глюкозы и пировиноградной кислоты в эритроцитах гибридных кур // Вестник сельскохозяйств. науки. - 1989, № 11. - С. 159-160.
13. Коношенко С.В. Сравнительная характеристика изоэлектрических спектров и сродства к кислороду гемоглобинов кур и домашних уток // Деп. в Укр. НИИНТИ, 1993.
14. Коношенко С.В. Порівняльна характеристика структурно-функціональної гетерогенності гемоглобінів хребетних // XIII Укр. фізіол. з'їзд: Тези допов., т. I, Київ, 1990. - С. 163.
15. Коношенко С.В. Изоэлектрическая гетерогенность и сродство к кислороду гемоглобина кур в зависимости от возраста // Укр. биохим.ж. - 1990. - т. 62, № 5. - С. 90-92.
16. Коношенко С.В. Структурно-функціональні властивості гемоглобінів двох видів земноводних // VI Укр.біохім. з'їзд: Тези допов., ч. I, Київ, 1992. - С. 14.
17. Коношенко С.В., Чмелёва С.И. Структурно-функциональные свойства гемоглобинов двух видов рыб: карпа и толстолоба // Биополимеры и клетка. - 1991. - т. 7, № 3. - С. 73-76.
18. Толкачёва Н.В., Коношенко С.В., Левачёв Н.Н., др. К вопросу о функциональных свойствах белков крови у высококвалифицированных спортсменов // Космическая биол. и авиакосм. медицина. - 1991, № 5. - С. 15-17.
19. Berzhansky M.V., Konoshenko S.V., Kokez V.L., Ostolovsky E.M. Study of the effect of protein dynamic state on desoxygenation of haemoglobin fractions // XV Internat.conf. of Magnetic Resonance in biol. systems. Jerusalem, Israel. - 1992. - P. 219.

20. Berzhansky M.V., Konoshenko S.V., Kunevich A.V., Ostolovsky E.M. H-NMR-relaxation at T  $\rightarrow$  R transition of haemoglobin // XV International conf. of magnetic resonance in biol. systems, Ierusalem, Israel.- 1992.- P.219.
21. Коношенко С.В. Внутримолекулярная подвижность и сродство к кислороду гемоглобинов среднеазиатской черепахи *Testudo Horsfieldi* и ужа водяного *Natrix tessellata* . Биополимеры и клетка , 1993. 9, № 6, стр. 47-50.
22. Коношенко С.В., Байала Иссо. Сравнительная характеристика внутримолекулярной подвижности и сродства к кислороду гемоглобинов в ряду позвоночных. Биополимеры и клетка. 1994, 10, №2, стр.72-74.



10. ...  
11. ...  
12. ...  
13. ...  
14. ...  
15. ...  
16. ...  
17. ...  
18. ...  
19. ...  
20. ...  
21. ...  
22. ...  
23. ...  
24. ...  
25. ...  
26. ...  
27. ...  
28. ...  
29. ...  
30. ...

Коллекция Карла Линнея  
Линнейская рукопись  
Линнейская рукопись, содержащая в себе описание  
Линнейская рукопись, содержащая в себе описание  
Линнейская рукопись, содержащая в себе описание  
Линнейская рукопись, содержащая в себе описание  
Линнейская рукопись, содержащая в себе описание  
Линнейская рукопись, содержащая в себе описание  
Линнейская рукопись, содержащая в себе описание  
Линнейская рукопись, содержащая в себе описание  
Линнейская рукопись, содержащая в себе описание  
Линнейская рукопись, содержащая в себе описание

АВ 30.038

**Коношенко Світлана Володимирівна**

**Порівняльна характеристика**

**структурних і функціональних особливостей гемоглобіну в ряду хребетних**

Сдано в набір 14.04.94. Подписано в печать 14.04.94.

Формат 60X84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага писчая. Печать роталитная.

Усл. печ. л. 2,7. Усл. кр.-отт. 2,93.

Тираж 100 экз. Заказ № 719. Бесплатно.

Гортипография, 333000, г. Симферополь, ул. Горького, 8.