

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ УКРАИНЫ
СИМФЕРОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

АБДЕЛЬ РАХМАН ЗЛЬТАХИР АХМЕД

УДК 547.963.4:577

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ
СТРУКТУРНЫХ СВОЙСТВ И СРОДСТВА К КИСЛОРОДУ
ГЕМОГЛОБИНА ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РАЗЛИЧНЫХ
КЛАССОВ ПОЗВОНОЧНЫХ

03.00.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Симферополь - 1995

544.1
AB 32.503
Работа выполнена на кафедре биохимии Симферопольского
государственного университета

Научный руководитель - доктор биологических наук
Конюшенко С.В.

Официальные оппоненты: член-корр. НАН Украины,
доктор биологических наук,
профессор Шульман Г.Е.;
академик Крымской АН,
доктор медицинских наук,
профессор Акицкий Г.Ю.

ЛНБ ім. В. Стефаника



00330541 (G)

Будущее учреждение: Киевский государственный
университет им. Т. Шевченко,
кафедра биохимии.

Защита диссертации состоится "21" июня 1995 г.
в 14⁰⁰ часов на заседании специализированного ученого
совета К. 20.02.02 при Симферопольском государственном уни-
верситете.

Адрес университета: 333036, Крым, г. Симферополь,
ул. Ялтинская, 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке универ-
ситета.

Автореферат разослан "20" мая 1995 г.

Ученый секретарь специализи-
рованного совета кандидат
биологических наук, доцент

А.В. Янцев

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

Актуальность проблемы. Вопросы эволюции относятся к числу общебиологических проблем, изучение которых проводится и на молекулярном уровне. С точки зрения систематики и эволюции большой интерес представляет не только изучение физиолого-биохимических особенностей организмов, но и детальное изучение и сопоставление физико-химических, структурных и функциональных особенностей физиологически активных молекул, а также молекулярных систем, выполняющих в организме важные биологические функции.

Наука, занимающаяся этими вопросами - сравнительная биохимия, относится к числу быстро развивающихся, особенно в последние два десятилетия.

При решении проблем сравнительной биохимии всё большее внимание исследователей привлекают гомологичные белки, выполняющие одну и ту же функцию в различных организмах / Крепс, 1976, 1983; Kimura, 1981; Finiwarter, 1987 /.

Гемоглобин, наряду с другими биополимерами, является одним из объектов филогенетического анализа / Zukerkandl, 1965, 1975, 1976; Ingram, 1963; Dayhoff, 1969, 1975, 1976, 1978; Kimura, 1981, 1985; Лукьяненко, др., 1991 /.

Важнейшая функция гемоглобина (присоединение и транспорт кислорода) и широкое распространение явились причиной огромного внимания, которое проявлялось и проявляется многими исследователями к данному белку крови.

Однако, несмотря на всю широту проводимых исследований работы по изучению структурных и функциональных свойств гемоглобинов в сравнительном аспекте не дают возможности дать полную оценку изменений различных параметров внутримолекулярной

структуры гемоглобина и его функциональной активности в процессе филогенеза. В связи с этим, дальнейшее накопление материала по сравнительному анализу гемоглобинов у животных разного уровня организации представляется весьма важным и актуальным.

Целью данной работы являлось дать филогенетическую оценку различий в некоторых структурных и функциональных свойствах гемоглобинов на уровне классов позвоночных.

В соответствии с этим, задачами работы было:

1. Дать оценку электрофоретической гетерогенности гемоглобинов отдельных представителей шести классов позвоночных.
2. Охарактеризовать средство к кислороду главных электрофоретических фракций гемоглобинов. Дать филогенетическую оценку различий гемоглобинов по средству к кислороду.
3. Изучить степень гидрофобности и микровязкости (плотности упаковки) центральных и периферийных областей молекул гемоглобинов.
4. Охарактеризовать общий объём гидрофобных полостей и содержание поверхностных тирозидов в составе молекул гемоглобинов.
5. Определить связь структурных свойств гемоглобинов с их функциональной активностью.

Научная новизна. Впервые по данным флуоресцентной спектроскопии показано, что периферийные области молекул гемоглобинов характеризуются большей вариабельностью размеров и уровня гидрофобности и меньшей вариабельностью плотности упаковки, тогда как центральные области молекул гемоглобинов отличаются меньшей вариабельностью размеров и степени гидрофобности, но большей вариабельностью плотности упаковки.

Установлены филогенетические различия гемоглобинов в уровне микровязкости центральных областей белковых молекул и обще-

го объёма гидрофобных полостей.

Показано, что микровязкость центральных областей молекул гемоглобинов снижается, тогда как общий объём их гидрофобных полостей увеличивается в направлении от класса круглоротых к млекопитающим.

Показано, что в характере изменений сродства главных фракций гемоглобинов к кислороду прослеживается определённая закономерность: снижение сродства гемоглобинов к кислороду при переходе от более низких филогенетических групп позвоночных к высшим.

Полученный экспериментальный материал даёт основание считать, что в филогенезе позвоночных происходили закономерные изменения внутримолекулярной структуры гемоглобина и его сродства к кислороду, способствующие более эффективной отдаче кислорода тканям.

Практическое и теоретическое значение работы полученных экспериментальных данные позволяют определить некоторые общие особенности и закономерности в развитии структурно-функциональных свойств гемоглобина в процессе филогенеза позвоночных.

Показано, что в процессе филогенеза снижается "жесткость" структуры молекул гемоглобина и, вместе с тем, снижается их сродство к кислороду, что может способствовать более эффективной отдаче кислорода тканям.

Результаты исследований имеют определённое практическое значения для уточнения и понимания филогенетических связей между отдельными группами и видами позвоночных, для биохимической систематики, а также используют при чтении лекций по общему курсу "Биологическая химия и молекулярная биология" и по специальным курсам "Структурно-функциональные свойства белков",

"Биохимия крови".

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. В характере изменений сродства к кислороду главных электрофоретических фракций гемоглобинов у представителей различных классов позвоночных прослеживается определённая закономерность: снижение сродства к кислороду при переходе от низших филогенетических групп позвоночных к высшим.
2. Периферийные области молекул гемоглобинов характеризуются большей вариабельностью уровня гидрофобности и значительно меньшей вариабельностью плотности упаковки. Центральные области молекул характеризуются меньшей вариабельностью степени гидрофобности, но большей вариабельностью плотности упаковки.
3. В процессе филогенеза позвоночных уменьшалась "жесткость" структуры молекул гемоглобина, о чём свидетельствуют снижение плотности упаковки центральных областей молекул гемоглобина и увеличение общего объёма гидрофобных полостей.

Апробация работы

Материалы диссертации докладывались: на научных конференциях профессорско-преподавательского состава Симферопольского госуниверситета (1994, 1995 г.г.) и на расширенном заседании кафедры биохимии Симферопольского университета.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы (2 главы), описания материалов и методов, результатов собственных исследований с их обсуждением (3 главы), 9 выводов и списка литературы (366 источников: из них 306 иностранных авторов). Диссертационная работа изложена на 145 страницах машинописного текста, включая 44 страницы списка литературы. Текст диссертации проиллюстрирован 5 таблицами и 18 ри-

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследований были половозрелые особи представителей шести классов позвоночных.

Класс млекопитающие: человек *Homo sapiens*, бык *Bos taurus*, свинья *Sus scrofa*, гренландский тюлень *Parophylus groenlandicus*.

Класс птицы: голубь *Columba livia*, домашние куры породы корниш *Gallus domesticus*.

Класс пресмыкающиеся: уж водяной *Natrix tessellata*.

Класс земноводные: лягушка травяная *Rana temporaria*, серая жаба *Bufo bufo*.

Класс костные рыбы: кефаль-сингиль *Mugil auratus*, карп *Cyprinus carpio*, толстолоб *Hyporhthalmichthys molitrix*.

Представитель класса круглоротые - минога речная *Lampetra fluviatilis*.

В каждой видовой группе класса было не менее II-ти особей.

Материалом исследования был гемоглобин. Гемоглобин выделяли из эритроцитов по методу Дрaбкина / Drabkin, 1949 /, но без толуола во избежание образования метгемоглобина. Концентрацию гемоглобина в гемолизатах определяли унифицированным гемоглобинцианидным методом. Электрофоретическую гетерогенность гемоглобинов определяли методом диск-электрофореза в 7%-ном полиакриламидном геле / Davis, 1964 /. Электрофоретические фракции гемоглобинов выделяли при помощи препаративного электрофореза в блоках 7%-ного ПААГ / Ажицкий, Багдасарьян, 1975 /. Анализ чистоты и гомогенности препаративно выделенных фракций проводили методом аналитического электрофореза в ПААГ. Количественное содержание метгемоглобина определяли цианметгемоглобиновым методом / Кушаковский, 1970 /.

Количество поверхностных тирозилов в составе молекул гемо-

глобинов определяли спектрофотометрическим методом титрования / Donovan J., 1973; Nilson, Linkskag, 1967 /. Гидрофобную структуру гемоглобинов исследовали методом солubilизации углеводов (бензола) с помощью рефрактометра ИРФ-23 при длине волны 589 нм / Измайлова, Ребиндер, 1974 /.

Внутримолекулярную структуру гемоглобинов изучали методами флуоресцентного анализа. В качестве флуоресцентных зондов использовали I-анилинафталин-8-сульфонат (АНС) и II-фенилнафталин (ФНА). Интенсивность флуоресценции зондов в растворах исследуемых белков измеряли на спектрофотометрической установке Туроверова / Гусев, Туроверов, Розанов и др., 1974 /. Интенсивность свечения регистрировали в максимуме полосы флуоресценции, длина волны возбуждения для двух зондов составляла 360 нм. Микровязкость различных участков белковой молекулы исследовали методом поляризации флуоресценции / Владимиров, Добрецов, 1980 /.

Сродство главных фракций гемоглобинов к кислороду изучали спектрофотометрическим методом построения кривых кислородной диссоциации / Шорохов, 1974 /, используя 0,5%-ные растворы гемоглобинов в 0,01 М трис-HCl буфере pH 7,0. Содержание метгемоглобина в исследуемых растворах не превышало 3%.

Цифровые данные, полученные в результате исследований, статистически обрабатывали по методу малых выборок / Бэйли, 1964 /. Объём совокупности составлял в среднем от 5 до 12. Сравнение двух переменных величин осуществляли на основании t-критерия Стьюдента. В диссертационной работе говорится об изменениях только в тех случаях, когда $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

I. Гетерогенность и сродство к кислороду гемоглобинов отдельных представителей позвоночных

I.I. Характеристика фракционного состава и электрофоретической подвижности гемоглибинов отдельных представителей позвоночных

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что подавляющее большинство исследуемых гемоглибинов у представителей различных классов позвоночных является гетерогенными. Большая часть гемоглибинов характеризуется содержанием двух или трёх электрофоретических фракций. Исключение составляют гемоглибины голубя (одна фракция) и гренландского тюленя (пять фракций). В каждой гетерогенной системе гемоглибина можно выделить одну или две фракции с наиболее высоким содержанием белка и минорные (рис. 1, табл. I).

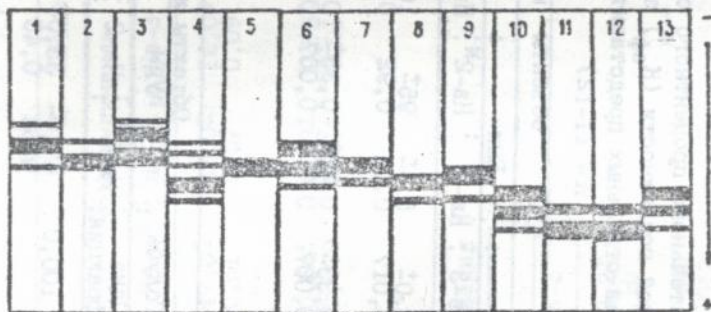


Рис. 1. Диск-электрофореграммы гемоглибинов:
1 - человека; 2 - быка; 3 - свиньи;
4 - тюленя; 5 - голубя; 6 - кур;
7 - ужа; 8 - травяной лягушки; 9 - серой жабы; 10 - кефали-сингиль; 11 - карпа;
12 - толстолоба; 13 - речной миноги.

При анализе данных электрофореза в ПААГ наблюдается тенденция снижения относительной электрофоретической подвижности ($K_{эф}$) изученных гемоглибинов в направлении от круглоротых и

Таблица I

Показатели относительного процентного содержания и относительной электрофоретической подвижности ($K_{эф}$) электрофоретических фракций гемоглобинов отдельных представителей позвоночных
(n = II-12)

Показатели	Объекты исследования											
	Человек			Бык			Свинья			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
Содержание, отн. %	2,0 \pm 0,015	95 \pm 0,85	3,0 \pm 0,017	5,0 \pm 0,04	95 \pm 0,92	16,7 \pm 0,14	46,8 \pm 0,60	36,5 \pm 0,48	11,35 \pm 0,092	13,3 \pm 0,095	11,5 \pm 0,098	
$K_{эф}$	0,21 \pm 0,006	0,25 \pm 0,006	0,33 \pm 0,007	0,25 \pm 0,007	0,35 \pm 0,007	0,19 \pm 0,004	0,24 \pm 0,006	0,38 \pm 0,008	0,28 \pm 0,006	0,33 \pm 0,007	0,42 \pm 0,009	

Показатели	Объекты исследования									
	Тюлень		Голубь	Куры			Уж		Лягушка	травяная
	Нв-4*	Нв-5	Одна фракция	Нв-1*	Нв-2	Нв-3	Нв-1*	Нв-2	Нв-1*	Нв-2
Содержание,	36,5 \pm 0,50	27,4 \pm 0,26	100,0	47,0 \pm 0,62	35,0 \pm 0,43	18,0 \pm 0,15	60,0 \pm 0,72	40,0 \pm 0,55	58,0 \pm 0,70	42,0 \pm 0,59
$K_{эф}$	0,52 \pm 0,009	0,56 \pm 0,01	0,43 \pm 0,008	0,29 \pm 0,005	0,43 \pm 0,008	0,46 \pm 0,008	0,38 \pm 0,008	0,45 \pm 0,009	0,47 \pm 0,008	0,59 \pm 0,009

Продолжение таблицы I

Показатели	Объекты исследования									
	Жаба серая		Кефаль-сингиль			Карп		Толстолоб		Минога
	Нв-1*	Нв-2	Нв-1*	Нв-2	Нв-3	Нв-1	Нв-2*	Нв-1	Нв-2*	Нв-1*
Содержание, отн. %	62,0 [±] 0,75	38,0 [±] 0,50	47,0 [±] 0,61	41,0 [±] 0,57	12,0 [±] 0,09	33,0 [±] 0,38	67,0 [±] 0,83	32,0 [±] 0,30	68,0 [±] 0,82	64,5 0,69
К эф	0,41 [±] 0,008	0,59 [±] 0,009	0,54 [±] 0,009	0,63 [±] 0,011	0,75 [±] 0,01	0,60 [±] 0,01	0,80 [±] 0,011	0,55 [±] 0,009	0,77 [±] 0,013	0,52 [±] 0,009

Показатели	Объект исследования	
	Минога	
	Нв-2	Нв-3

Содержание, отн. %	22,3 [±] 0,18	13,2 [±] 0,10
К эф	0,63 [±] 0,009	0,78 [±] 0,012

* - фракции с наиболее высоким содержанием белка

рыб к млекопитающим. Так, если величина $K_{эф}$ главных и минорных фракций гемоглобинов у представителей круглоротых и рыб варьирует в пределах 0,52-0,80, то для гемоглобинов представителей других классов позвоночных значения $K_{эф}$ заметно снижаются: у земноводных - 0,41-0,59; у пресмыкающихся - 0,38-0,45; у птиц - 0,29-0,46; у наземных млекопитающих - 0,19-0,30; $K_{эф}$ фракций гемоглобина гренландского тюленя находятся в пределах 0,28-0,56.

1.2. Характеристика сродства к кислороду главных электрофоретических фракций гемоглобинов

Важным показателем функциональной активности гемоглобина является его сродство к кислороду. В наших исследованиях были изучены кривые кислородной диссоциации главных фракций гемоглобинов, отличающихся от других электрофоретических фракций наиболее высоким содержанием белка (табл. 2).

Таблица 2

Показатели полунасыщения кислородом (P_{50} , мм рт.ст.) главных электрофоретических фракций гемоглобинов отдельных представителей позвоночных ($M \pm m$; $n = 7-8$)

Класс	Объект	P_{50}
Млекопитающие	Человек	$26 \pm 0,9$
	Бык	$26 \pm 1,1$
	Свинья	$25 \pm 0,8$
	Тюлень	$22 \pm 1,1$
Птицы	Голубь	$30 \pm 1,1$
	Куры	$29 \pm 0,7$
Пресмыкающиеся	Уж водяной	$27 \pm 0,9$
Земноводные	Лягушка травяная	$22 \pm 0,9$
	Серая жаба	$25 \pm 0,9$
Рыбы	Кефаль-сингиль	$20 \pm 0,8$
	Карп	$17 \pm 0,8$
	Толстолоб	$18 \pm 0,7$
Круглоротые	Минога речная	$17 \pm 0,9$

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в ряду изученных гемоглобинов наиболее высоким сродством к кислороду характеризуются гемоглобины речной миноги и представителей класса рыб (кефали-сингиль, карпа и толстолоба). Величины полунасыщения кислородом их главных фракций (P_{50}) находятся в пределах от 17 до 20 мм рт.ст.

Сродство к кислороду гемоглобинов других позвоночных также имеет определённые филогенетические особенности.

У представителей земноводных (лягушка и жаба) и пресмыкающихся (уж) наблюдается меньшее сродство к кислороду главных фракций гемоглобинов (P_{50} находится в пределах от 22 до 27 мм рт.ст.). В большей степени снижение сродства гемоглобинов к кислороду наблюдается у представителей класса птиц (голубь, домашние куры). Величина P_{50} данных гемоглобинов составляет 30 и 29 мм рт.ст., соответственно. У представителей класса млекопитающих отмечена некоторая стабилизация функционального показателя гемоглобинов.

Таким образом, в ряду изученных гемоглобинов прослеживается снижение сродства к кислороду их главных фракций при переходе от более низких филогенетических групп позвоночных к высшим. Наиболее значительные различия гемоглобинов в величине P_{50} отмечены при переходе от представителей класса рыб к земноводным и от земноводных и пресмыкающихся к представителям класса птиц.

2. Филогенетические особенности структурных свойств гемоглобинов позвоночных

2.1. Анализ внутримолекулярной организации центральных и периферийных областей гемоглобинов позвоночных

Применение флуоресцентного анализа позволило установить филогенетические особенности внутримолекулярной организации гемоглобинов. В наших исследованиях проводилось определение интенсивности флуоресценции зондов АФС и ФНА в растворах гемоглоби-

ноз, что давало возможность оценить степень гидрофобности областей, занимаемых зондами в белковой молекуле. АНС занимает менее гидрофобные (периферийные) области белковой молекулы, тогда как ФНА - наиболее гидрофобные (прежде всего, гидрофобное ядро глобулы). Чем выше интенсивность флуоресценции зонда, тем больше размеры и гидрофобность соответствующих областей глобулы / Остоловский, др., 1988 /.

Как следует из данных табл. 3 главные фракции исследуемых гемоглобинов характеризуются достоверными видовыми различиями по интенсивности флуоресценции в них зонда АНС ($P < 0,05$). Максимальный диапазон различий гемоглобинов по интенсивности флуоресценции АНС составляет 39 ед. Вместе с тем, прослеживается относительная стабильность данного показателя на уровне классов позвоночных. Исключение составляют гемоглобины млекопитающих (человек, бык, свинья, тюлень), для которых показана более низкая интенсивность флуоресценции АНС по сравнению с гемоглобинами представителей других классов позвоночных.

Интенсивность флуоресценции в гемоглобинах более гидрофобного зонда ФНА также характеризуется видовыми различиями. Наиболее высокий уровень флуоресценции ФНА установлен для гемоглобинов кур, толстолоба и речной миноги (34,33 и 35 ед., соответственно), а наиболее низкий - для гемоглобина гренландского тюленя (13,9 ед.). Максимальный диапазон различий гемоглобинов по интенсивности флуоресценции в них ФНА составляет 21 ед., что почти в 2 раза меньше различий, установленных для АНС. Как и в случае АНС прослеживается стабильность соответствующего показателя для ФНА на уровне классов позвоночных, которая, однако, по сравнению с АНС носит более выраженный характер и сохраняется во всем ряду позвоночных: от представителя класса круглоротых до представителей класса млекопитающих.

Дальнейшее изучение внутримолекулярной структурной органи-

Таблица 3

Интенсивность флуоресценции (F) зондов АНС и ФНА, анизотропия (A) и показатель микровязкости (ζ) для главных фракций гемоглобинов отдельных представителей позвоночных ($M \pm m$; n = 5)

Класс позвоночных	Объект	F, отн.ед.		A		, ζ	
		АНС	ФНА	АНС	ФНА	АНС	ФНА
Млекопитающие	Человек	18,1 \pm 0,35	28,5 \pm 0,45	0,123 \pm 0,004	0,156 \pm 0,003	0,049 \pm 0,001	0,060 \pm 0,001
	Бык	22,0 \pm 0,44	23,0 \pm 0,42	0,123 \pm 0,004	0,153 \pm 0,004	0,049 \pm 0,002	0,058 \pm 0,002
	Свинья	30,8 \pm 0,48	17,0 \pm 0,40	0,122 \pm 0,005	0,153 \pm 0,003	0,049 \pm 0,001	0,058 \pm 0,001
	Тюлень	34,8 \pm 0,46	13,9 \pm 0,38	0,127 \pm 0,006	0,156 \pm 0,002	0,051 \pm 0,002	0,060 \pm 0,002
Птицы	Голубь	26,0 \pm 0,35	19,0 \pm 0,35	0,128 \pm 0,008	0,153 \pm 0,004	0,051 \pm 0,001	0,058 \pm 0,002
	Куры	47,2 \pm 0,50	34,0 \pm 0,44	0,115 \pm 0,008	0,115 \pm 0,003	0,046 \pm 0,001	0,050 \pm 0,003
Пресмыкающиеся	Уж водяной	40,0 \pm 0,48	22,5 \pm 0,42	0,110 \pm 0,006	0,158 \pm 0,002	0,044 \pm 0,002	0,062 \pm 0,001
Земноводные	Лягушка травяная	41,0 \pm 0,46	18,5 \pm 0,40	0,115 \pm 0,004	0,168 \pm 0,003	0,046 \pm 0,001	0,064 \pm 0,002
	Серая жаба	57,0 \pm 0,53	18,5 \pm 0,42	0,126 \pm 0,003	0,166 \pm 0,002	0,050 \pm 0,003	0,063 \pm 0,001
Рыбы	Кефаль-сингиль	39,2 \pm 0,45	29,0 \pm 0,40	0,126 \pm 0,006	0,172 \pm 0,002	0,050 \pm 0,002	0,068 \pm 0,001
	Карп	42,8 \pm 0,47	18,0 \pm 0,39	0,127 \pm 0,006	0,176 \pm 0,003	0,051 \pm 0,002	0,070 \pm 0,002
	Толстолоб	37,2 \pm 0,44	33,0 \pm 0,45	0,124 \pm 0,004	0,176 \pm 0,005	0,050 \pm 0,001	0,070 \pm 0,003
Круглоротые	Минога речная	42,5 \pm 0,48	35,0 \pm 0,47	0,145 \pm 0,006	0,190 \pm 0,004	0,060 \pm 0,001	0,080 \pm 0,002

зации гемоглобинов было связано с определением показателя микровязкости различных участков белковой молекулы. Для этого использовали метод поляризации флуоресценции зондов (табл. 3). Уровень поляризации и анизотропии флуоресценции зондов в растворах белка характеризует степень микровязкости различных участков белковой глобулы, тем самым свидетельствуя о плотности или "жесткости" упаковки глобулы в её отдельных частях: чем выше микровязкость, тем более плотной является упаковка соответствующих участков глобулы / Остоловский, др., 1990 /.

Как следует из данных табл. 3, микровязкость зон сорбции АНС в гемоглобинах (периферийные участки глобулы) находится в пределах 0,044-0,060 пуаз. Наиболее низким уровнем микровязкости зон сорбции АНС характеризуется гемоглобин ужа, наиболее высоким - гемоглобин речной миноги. Показаны достоверные видовые различия гемоглобинов в значениях показателя микровязкости у представителей класса птиц (голубь, домашние куры), земноводных (травяная лягушка, серая жаба), круглоротых (речная минога). Прослеживается незначительная вариабельность данного структурного параметра гемоглобинов при переходе от класса рыб к классу млекопитающих. Исключение составляет гемоглобин речной миноги, для которого установлено достоверно более высокое значение микровязкости окружения зонда АНС по сравнению с гемоглобинами представителей других классов позвоночных.

Микровязкость зон сорбции ФНА в исследуемых гемоглобинах, в среднем, в 1,5 раза превосходит микровязкость областей, занятых АНС, что свидетельствует о большей плотности упаковки центральных областей молекул гемоглобинов. Максимальный диапазон различий гемоглобинов по микровязкости окружения зонда ФНА составляет 0,03 пуаз, что в 2 раза превышает диапазон различий, установленных для АНС.

В отличие от показателя микровязкости зон сорбции АНС в изменениях показателя микровязкости зон сорбции ФНА прослеживается определённая закономерность: снижение микровязкости областей, занятых ФНА при переходе от низших филогенетических групп позвоночных к высшим. Наиболее выраженные изменения показателя микровязкости наблюдаются при переходе от класса круглоротых к классу рыб, от класса рыб к классу земноводных и от пресмыкающихся к классам птиц и млекопитающих (рис. 2). Сопоставление данных по микровязкости зон сорбции ФНА и средства гемоглобинов к кислороду свидетельствует о взаимосвязи структурного и функционального показателей: при переходе от низших филогенетических групп позвоночных к высшим прослеживается снижение как средства главных фракций гемоглобинов к кислороду, так и плотности упаковки центральных областей их молекул.

На основании результатов флуоресцентного анализа можно сделать предположение о том, что на изменения внутримолекулярной структуры гемоглобина, которые осуществлялись в процессе филогенеза, накладывались определённые ограничения. Центральные области молекулы гемоглобина претерпевали более жёсткие ограничения в размерах и степени гидрофобности, что должно быть принципиально важным для поддержания пространственной структуры молекулы и её оптимального функционирования. Периферийные области молекулы гемоглобина претерпевали более жёсткие ограничения в плотности упаковки, что также могло иметь большое значение для сохранения общей структурной организации каждой из субъединиц.

2.2. Характеристика общего объёма гидрофобных полостей и содержания поверхностных тирозилов в гемоглобинах позвоночных

Применив метод сольбилизации углеводорода (бензола) главными фракциями гемоглобинов мы определили общие объёмы гидрофобных полостей, рассчитав величину связывания бензола этими

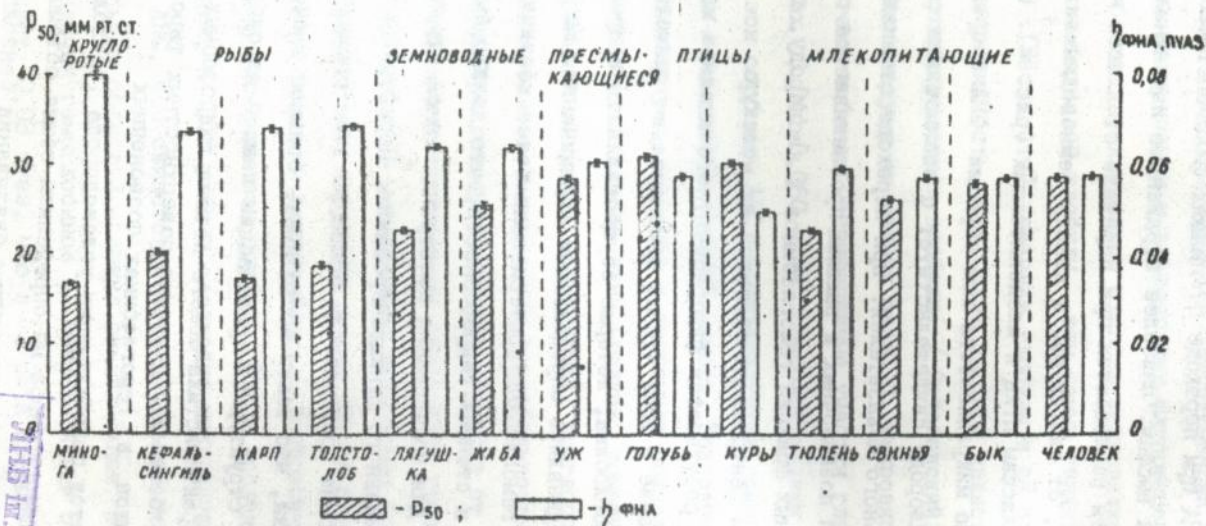


Рис. 2. Взаимосвязь показателей микровязкости зон сорбции ФНА (h) и средства к кислороду (P_{50}) для главных фракций гемоглобинов отдельных представителей различных классов позвоночных

белками (таблица 4).

Таблица 4

Солобилизация бензола главными фракциями гемоглобинов и количество поверхностных тирозилов в составе их молекул ($n = 5$)

Класс позвоночных	Объект	Степень связывания бензола белком (N : моль/моль)	Общий объём гидрофобных полостей (V : Å^3)	% поверхностных тирозилов
Млекопитающие	Человек	169 ± 3	24690 ± 421	$37,5 \pm 1,8$
	Бык	165 ± 2	24106 ± 342	$40,0 \pm 1,2$
	Свинья	167 ± 3	24398 ± 267	$40,0 \pm 1,7$
	Толень	143 ± 2	23434 ± 413	$40,0 \pm 1,4$
Птицы	Голубь	156 ± 2	22776 ± 298	$25,0 \pm 1,2$
	Куры	160 ± 5	23354 ± 700	$26,7 \pm 1,9$
Пресмыкающиеся	Уж водяной	134 ± 6	19528 ± 760	$30,0 \pm 1,8$
Земноводные	Дягушка травяная	125 ± 5	18214 ± 543	$31,6 \pm 1,7$
	Серая жаба	131 ± 3	19090 ± 421	$28,6 \pm 1,5$
Рыбы	Кефаль-сингиль	112 ± 3	16374 ± 382	$26,7 \pm 1,0$
	Карп	105 ± 3	15330 ± 422	$23,5 \pm 1,1$
	Толстолоб	107 ± 2	16622 ± 430	$25,0 \pm 1,2$
Круглоротые	Минога речная	35 ± 1	5110 ± 215	$25,0 \pm 1,4$

Оказалось, что величина связывания бензола гемоглобинами различна и составляет от 35 молей (гемоглобин миноги) до 169 молей (гемоглобин человека) углеводорода на одну молекулу белка.

За исключением гемоглобина миноги, в ряду изученных тетрамерных гемоглобинов наименьшим общим объёмом гидрофобных полостей, доступных для бензола, характеризуются гемоглобины рыб (15330 \AA^3 - 16374 \AA^3), а наибольшим гемоглобины млекопитающих (23434 \AA^3 - 24690 \AA^3).

В ряду взятых представителей позвоночных прослеживается незначительное, но достоверное увеличение общего объёма гидрофобных полостей гемоглобинов в направлении от класса круглоро-

тых и класса рыб к классу млекопитающих. Наиболее выраженные изменения данного структурного параметра в ряду тетрамерных гемоглобинов наблюдаются при переходе от класса рыб к классу земноводных и от пресмыкающихся к классу птиц и к млекопитающим, что соответствует характеру изменений в гемоглобинах плотности упаковки центральных областей их молекул (рис. 3).

Основываясь на представлениях о взаимосвязи общего объема гидрофобных полостей белковых молекул с "жесткостью" их структуры / Измайлова, др., 1974; Остоловский, др., 1990 /, а также на данных флуоресцентного анализа, можно предположить, что в филогенезе позвоночных уменьшалась "жесткость" структуры гемоглобина, что должно было отразиться на его функциональной активности, в частности, на сродстве к кислороду.

Так как изменения в структурных параметрах белков могут быть обусловлены количеством и распределением в белковых глобулах остатков тирозина, нами было проведено определение количества тирозилов, локализованных на поверхности молекул гемоглобинов (табл. 4). Содержание поверхностных тирозилов в главных фракциях гемоглобинов находится в пределах от 23,5% до 40,0% от общего содержания остатков тирозина в исследуемых белках. За исключением гемоглобинов млекопитающих гемоглобины остальных представителей позвоночных характеризуются сравнительно меньшим процентным содержанием поверхностных тирозилов (от 23,5% до 31,6%). У представителей класса млекопитающих содержание поверхностных тирозилов в гемоглобинах составляет от 37,5% (гемоглобин человека) до 40,0% (гемоглобины быка, свиньи и тюленя).

Наблюдается взаимосвязь в данных по количеству поверхностных тирозилов и уровня флуоресценции зонда АНС в главных фракциях гемоглобинов млекопитающих: меньшая гидрофобность периферийных участков молекул гемоглобинов сочетается с большей локализацией тирозилов на их поверхности.

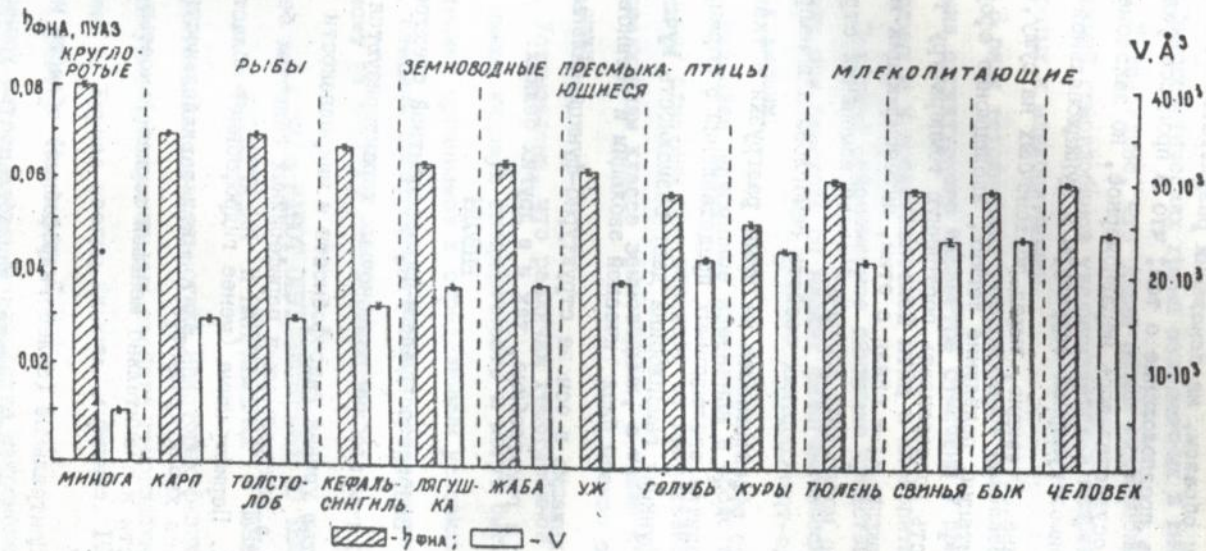


Рис. 3. Взаимосвязь микровязкости зон сорбции ФНА (η) и общего объема гидрофобных полостей (V) для главных фракций гемоглобинов отдельных представителей различных классов позвоночных

Таким образом, на основании результатов исследований можно сделать предположение о том, что в процессе филогенеза позвоночных осуществлялось неравномерное, но закономерное развитие внутримолекулярной структуры и функциональной активности гемоглобина. Счевидно, выход позвоночных на сушу, преодоление сил гравитации, появление легких, эволюционно сформированная способность поддерживать постоянную температуру тела у птиц и млекопитающих и, в связи с этим, интенсификация метаболизма, — всё это могло быть движущей силой изменений структурных и кислородо-транспортных свойств гемоглобина в направлении повышения его эффективности на этапе разгрузки в тканях.

Развитие эволюционных представлений о формировании структуры и функции гемоглобина даёт возможность лучше понять молекулярные основы биологической эволюции и установить закономерности, лежащие в основе структурно-функциональных взаимосвязей как в гемоглобине, так и в других белках.

ВЫВОДЫ

1. Впервые по данным флуоресцентной спектроскопии показано, что гемоглобины позвоночных характеризуются видовой специфичностью уровня гидрофобности и микровязкости (плотности упаковки) в центральных и периферийных областях белковой молекулы.

2. Периферийные (менее гидрофобные) области молекул гемоглобинов характеризуются большей вариабельностью уровня гидрофобности и значительно меньшей вариабельностью плотности упаковки.

Центральные (более гидрофобные) области молекул гемоглобинов отличаются меньшей вариабельностью уровня гидрофобности, но большей вариабельностью плотности упаковки.

3. Показано закономерное снижение плотности упаковки в

более гидрофобных участках молекул гемоглобина при переходе от низших филогенетических групп позвоночных к высшим.

4. Установлено, что общий объём гидрофобных полостей главных фракций гемоглобинов увеличивается в направлении от класса круглоротых к млекопитающим.

В ряду тетрамерных гемоглобинов наиболее значительные изменения структурного параметра отмечены у представителей класса земноводных и у представителей птиц и млекопитающих.

5. Показано закономерное снижение средства гемоглобинов к кислороду при переходе от низших филогенетических групп позвоночных к высшим.

Наиболее выраженные изменения в средстве гемоглобинов к кислороду отмечены при переходе от представителей класса рыб к представителям класса земноводных, а также к представителям класса птиц.

6. Установлено, что различия гемоглобинов в средстве к кислороду имеют видовую специфичность и могут быть обусловлены приспособлением организмов к определенным условиям существования.

7. Степень электрофоретической гетерогенности гемоглобинов не зависит от видовой специфичности.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ И НАПРАВЛЕННЫХ В ПЕЧАТЬ

1. Сравнительная характеристика некоторых физико-химических и структурно-функциональных свойств гемоглобина в ряду позвоночных // Журнал эволюц. биохим. и физиол. 1994, № 5. - С. 663-689 (соавтор Коношенко С.В.).
2. Структурно-функциональные свойства макромолекул и особенности метаболических процессов при различных состояниях организма // Вестник Симферопольского университета, ч. I, Симферополь, СГУ, 1995. - С. 153-157.

3. К вопросу о внутримолекулярной структуре гемоглобина позвоночных // Биофизика (в печати, соавтор Коношенко С.В.).
4. О видовой специфичности внутримолекулярной структуры гемоглобина позвоночных // Журнал эволюционной биохимии и физиологии (в печати, соавтор Коношенко С.В.)

АННОТАЦИИ

Абдель Рахман Эльтахир. Сравнительная характеристика некоторых структурных свойств и сродства к кислороду гемоглобина представителей различных классов позвоночных.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия, Симферополь, 1995.

Методами флуоресцентного анализа изучены филогенетические особенности уровня гидрофобности и микровязкости различных областей молекул гемоглобина представителей различных классов позвоночных. Показано снижение "жёсткости" общей структуры и плотности упаковки центральных областей молекул гемоглобина, а также снижение сродства к кислороду при переходе от более низких филогенетических групп позвоночных к высшим.

Абдель Рахман Ельтахір. Порівняльна характеристика деяких структурних властивостей та спорідненості до кисню гемоглобіну представників різних класів хребетних.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук з спеціальності 03.00.04 - біохімія, Сімферополь, 1995.

Методами флуоресцентного аналізу вивчені філогенетичні особливості рівня гідрофобності та мікров'язкості окремих ділянок молекул гемоглобіну представників різних класів хребетних. Показано деяке зниження компактності загальної структури і щільності упакування центральних ділянок молекул гемоглобіну, а також зниження спорідненості до кисню при переході від більш низьких філогенетичних груп хребетних до більш вищих.

Abdel Rahman Eltahir. Comparative characteristic of some structural properties and affinity to oxygen of haemoglobin of representatives of different classes of vertebrates.

By methods of fluorescence analysis a phylogenetic peculiarities of hydrophobicity and microviscosity of different parts of haemoglobin molecules of representatives of different classes of vertebrates has been studied. The lowering of total structure rigidly, compact of central parts of haemoglobin molecules and the affinity to oxygen have been observed in the course of the transition from the lowest phylogenetic groups of vertebrates to the highest ones.

Ключевые слова: гемоглобин, средство к кислороду, гидрофобность, микровязкость, плотность упаковки.

ref.?

Ab 32.505

Ab 32.505

674949

AB32.503

AB 32.503

ONE TWO