

Внутримолекулярная структура и окислительная модификация главных фракций гемоглобинов отдельных представителей млекопитающих и рыб

С. В. Коношенко, А. А. Гидулянов

Таврический национальный университет им. В. И. Вернадского Министерства образования и науки Украины
Ул. Ялтинская, 4, Симферополь, 95007, Украины

Обсуждаются филогенетические особенности общего объема гидрофобных полостей и степени гидрофобности центральных участков молекул главных фракций гемоглобинов отдельных представителей класса млекопитающих и класса рыб. Установлено, что гемоглобины позвоночных подвергаются окислительной модификации в эритроцитах, уровень которой имеет видовую специфичность и определенную зависимость от внутримолекулярной структуры белка. У представителей класса млекопитающих прослеживается прямая связь между общим объемом гидрофобных полостей молекул гемоглобинов и уровнем продуктов окислительной модификации основного характера, что проявляется в условиях инициации окислительных процессов. У представителей класса рыб выявлена обратная связь между соответствующими показателями гемоглобинов в их исходном состоянии, до инициации окислительных процессов.

Введение. Изучение влияния активных форм кислорода (АФК) на биологические системы привлекает внимание исследователей на протяжении многих лет и до сих пор не утратило своей актуальности. В настоящее время имеются многочисленные данные, касающиеся изучения механизмов перекисного окисления липидов и его роли в нормальном функционировании клеток и в патогенезе различных заболеваний [1—4]. Однако активные формы кислорода способны вызывать окислительную деструкцию не только липидов, но также нуклеиновых кислот и белковых молекул [5, 6]. Этот процесс считается одной из возможных причин инактивации ферментов, изменения конформации белков при состоянии окислительного стресса. Представляется важным понять зависимость окислительной модификации белков от их структурной организации. Решение этих вопросов в филогенетическом аспекте может способствовать более глубокому пониманию влияния реакций пероксидации на структурно-функциональный статус отдельных молекулярных систем, в том числе и системы гемоглобина.

В связи с этим целью данной работы явилось сравнительное изучение окислительной модификации главных фракций гемоглобинов отдельных представителей млекопитающих и рыб в зависимости от внутримолекулярной структуры белковых молекул.

Материалы и методы. Материалом для исследований служили главные фракции гемоглобинов трех представителей класса млекопитающих — человека (*Homo sapiens*), быка (*Bos taurus*) и свиньи (*Sus scrofa*) и трех представителей класса рыб — карпа (*Cyprinus carpio*), карася (*Carassius auratus gibelio*) и судака (*Lucioperca luceoperca*). В каждой видовой группе было не менее 30 особей. Гемоглобин выделяли по методу Дабкина [7]. Выделение фракций гемоглобина и проверку их гомогенности осуществляли методами препаративного и аналитического электрофореза в 7 %-м полиакриламидном геле [8, 9]. Внутримолекулярную структуру гемоглобинов изучали, определяя общий объем гидрофобных полостей и уровень гидрофобности центральных участков белковых молекул. Внутримолекулярную гидрофобность гемоглобинов оценивали по уровню флуоресценции зонда N-фенилнафтиламина (ФНА) в растворе белка на спектрофлуори-

Таблица 1

Интенсивность флуоресценции (F) и общий объем гидрофобных полостей (V) главных фракций гемоглобинов отдельных представителей позвоночных ($M \pm m$)

Объект исследования	F , усл. ед. (максимум полосы свечения)	Степень связывания бензола белком, N , моль/моль	Общий объем гидрофобных полостей, Å^3
Человек	$41,83 \pm 3,56$	433 ± 15	63400 ± 3630
Бык	$39,78 \pm 3,13$	522 ± 20	76389 ± 3840
Свинья	$41,66 \pm 6,64$	346 ± 11	50562 ± 3300
Карп	$172 \pm 1,00$	$288 \pm 5,98$	42065 ± 873
Карась	$187 \pm 10,52$	$250 \pm 26,58$	36512 ± 3908
Судак	$177,5 \pm 4,17$	$302 \pm 5,57$	44149 ± 813

метре «Shimadzu PR» (Япония) [10]. Соотношение зонда и белка было равным 1:68. Длина волны возбуждения составляла 300 нм, регистрации — 436 нм. Общий объем гидрофобных полостей в гемоглобинах определяли методом солюбилизации углеводорода (бензола) при помощи рефрактометра ИРФ-23 [11]. Окислительную модификацию фракций гемоглобинов анализировали на основе метода, описанного в литературе, без инициации и с инициацией окислительных процессов [6].

Для инициации процессов окисления растворы гемоглобинов инкубировали с 15 мМ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и с 4 мМ H_2O_2 в течение 15 мин. Продукты окислительной модификации (альдегидные и кетонные производные аминокислотных остатков) регистрировали в форме кетондинитрофенилгидразинов при 370 нм (нейтрального характера) и при 430 и 530 нм (основного характера), содержание которых выражали в единицах оптической плотности (ОП).

Результаты и обсуждение. Как свидетельствуют результаты исследований, представленные в табл. 1, интенсивность флуоресценции зонда ФНА в главных фракциях гемоглобина человека, быка и свиньи является практически одинаковой и характеризуется величинами в диапазоне $39,78 \pm 3,13$ — $41,83 \pm 3,56$ усл. ед. Значения максимума полосы свечения зонда в главных фракциях гемоглобинов отдельных представителей рыб значительно превосходят (в среднем в 3,5 раза) величины данного показателя, установленного для соответствующих фракций гемоглобинов млекопитающих и находятся в пределах $172 \pm 1,0$ — $187 \pm 10,5$ усл. ед. Известно, что зонд ФНА является гидрофобным по своей природе и проникает, в основном, в центральные участки белковой глобулы [10]. Исходя из этого можно предположить, что центральные участки молекул главных фракций гемоглобинов рыб отличаются большей гидрофобностью по сравнению с аналогичными фракциями гемоглобинов млекопи-

тающих. Вместе с тем проявляется хорошо выраженная консервативность уровня гидрофобности центральных зон молекул гемоглобинов у представителей одного и того же класса позвоночных. Плотность упаковки молекул гемоглобина оценивали по общему объему гидрофобных полостей, используя метод солюбилизации бензола белком.

Установлено, что величина связывания бензола изученными гемоглобинами имеет видовую зависимость и находится в пределах от 346 до 522 моль углеводорода на молекулу белка у представителей класса млекопитающих и в пределах от 250 до 302 моль/моль белка у представителей класса рыб (табл. 1). Расчет общего объема гидрофобных полостей белковых молекул показал, что главные фракции гемоглобинов рыб характеризуются меньшей величиной данного структурного параметра по сравнению с представителями класса млекопитающих. Так, если у млекопитающих среднее значение объема гидрофобных полостей гемоглобинов составляет $63449 \pm 3590 \text{ Å}^3$, то у представителей класса рыб эта величина равняется $40909 \pm 1864 \text{ Å}^3$.

В более ранних работах [12] на основании данных ЯМР-релаксации в протонных системах показано, что внутримолекулярная динамика гемоглобинов характеризуется филогенетическими особенностями. В частности установлено, что в процессе филогенеза происходило закономерное увеличение внутримолекулярной подвижности молекул гемоглобинов позвоночных.

С учетом представленных результатов можно сделать вывод о том, что в ходе эволюции претерпевали однонаправленные изменения такие структурные параметры гемоглобина, как плотность упаковки белковых глобул и степень их внутримолекулярной гидрофобности. Характер этих изменений может свидетельствовать о снижении «жесткости» внутримолекулярной структуры гемоглобина в про-

Таблица 2

Содержание продуктов окислительной модификации в главных фракциях гемоглобинов до и после инициации окислительных процессов ($M \pm m$)

Объект исследования	Продукты окислительной модификации, ед. оптической плотности				
	До инициации			После инициации	
	370 нм	430 нм	530 нм	430 нм	530 нм
Человек	0,382±0,0024	0,206±0,0022	0,046±0,0020	0,192±0,0054	0,048±0,0050
Бык	0,088±0,0011	0,072±0,0033	0,024±0,0010	0,127±0,0029	0,060±0,0048
Свинья	0,116±0,0032	0,101±0,0049	0,0176±0,0022	0,146±0,0074	0,034±0,0039
Карп	0,530±0,0037	0,157±0,0036	0,039±0,0064	0,110±0,0020	0,056±0,0023
Карась	0,327±0,0038	0,376±0,0076	0,097±0,0058	0,118±0,0058	0,090±0,0046
Судак	0,135±0,0025	0,032±0,011	0,016±0,0023	0,069±0,0057	0,1±0,0016

цессе филогенеза, при переходе от более низших (пойкилотермных) к более высшим (гомойотермным) классам позвоночных.

Изучение окислительной модификации главных фракций гемоглобинов показало, что практически все они содержат альдегидные и кетонные группировки аминокислотных остатков, которые взаимодействуют с 2,4-динитрофенилгидразином и регистрируются при 370 нм (продукты окислительной модификации нейтрального характера) и при 430 и 530 нм (основного характера). Как следует из полученных данных (табл. 2), у представителей млекопитающих содержание продуктов окислительной модификации нейтрального характера ($\lambda = 370$ нм) в главных фракциях гемоглобинов находится в пределах от 0,088 до 0,382 ед. ОП., у рыб — в пределах от 0,135 до 0,530 ед. ОП. Уровень продуктов окислительной модификации основного характера, регистрируемых при длине волны 430 нм, у млекопитающих показан в пределах 0,072—0,206 ед. ОП., у рыб — в пределах 0,032—0,376 ед. ОП. При длине волны 530 нм регистрировали наименьшее количество продуктов модификации основного характера: у млекопитающих — от 0,018 до 0,046 ед. ОП., у рыб — от 0,016 до 0,097 ед. ОП. В целом, несмотря на перекрываемость значений показателей окислительной модификации гемоглобинов, прослеживается хорошо выраженная тенденция к их преобладанию у рыб по сравнению с млекопитающими.

Представляло интерес оценить устойчивость гемоглобинов к окислительной модификации в условиях инициации реакций окисления *in vitro*. Для инициации процессов окисления растворы гемоглобинов инкубировали с $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и H_2O_2 . Из полученных в этих условиях данных обращают на себя внимание прежде всего те, которые отражают

уровень продуктов окислительной модификации основного характера, регистрируемых при длине волны 530 нм.

Видно, что в главных фракциях гемоглобинов человека и карася содержание соответствующих продуктов окислительной модификации практически не менялось по сравнению с их уровнем до инициации окислительных процессов. Вместе с тем у других представителей позвоночных отмечен заметный рост содержания окислительных продуктов. Этот факт заслуживает внимания, поскольку в исходном состоянии гемоглобины человека и карася отличались наиболее высоким содержанием продуктов окислительной модификации по сравнению с гемоглобинами других представителей млекопитающих и рыб соответственно. Можно предположить, что определенные участки молекул одних гемоглобинов достигают максимального уровня окислительной модификации в эритроцитах, тогда как у других имеется резерв аминокислотных остатков, доступных для окислительных реакций в условиях их инициации.

Сравнительный анализ полученных результатов позволил установить, что у представителей класса млекопитающих прослеживается хорошо выраженная положительная корреляция ($r = +0,95$) между общим объемом гидрофобных полостей молекул гемоглобинов и уровнем продуктов окислительной модификации основного характера, регистрируемых при 530 нм после инициации окислительных процессов (рис. 1). У представителей класса рыб отмечена отрицательная корреляция между объемом гидрофобных полостей белковых молекул и уровнем продуктов окислительной модификации основного характера, которые регистрировались при 430 ($r = -0,9$) и 530 нм ($r = -0,95$) до инициации окислительных процессов (рис. 2).

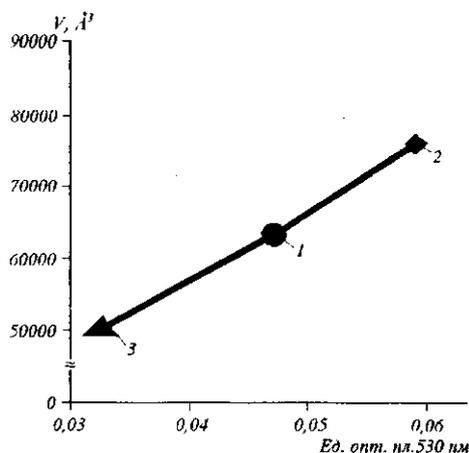


Рис. 1. Взаимосвязь общего объема гидрофобных полостей (V , Å^3) и уровня содержания продуктов окислительной модификации в главных фракциях гемоглобинов: человека (1), быка (2) и свиньи (3) после инициации окислительных процессов

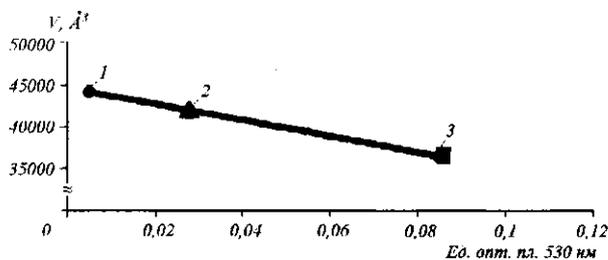


Рис. 2. Взаимосвязь общего объема гидрофобных полостей (V , Å^3) и уровня содержания продуктов окислительной модификации в главных фракциях гемоглобинов: судака (1), карпа (2) и караса (3) до инициации окислительных процессов

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что процессы окислительной модификации гемоглобина в эритроцитах в определенной мере зависят от структурной организации белка. Поскольку для гемоглобинов млекопитающих показан больший объем гидрофобных полостей и, следовательно, меньшая плотность упаковки белковых молекул по сравнению с гемоглобинами рыб, можно предположить, что в таких гемоглобинах для окислительной модификации доступны не только поверхностные, но и более глубокие слои белковой глобулы. В связи с этим вполне очевидно, что менее «компактные» белковые глобулы в большей степени подвержены воздействию активных форм кислорода.

Гемоглобины рыб отличаются как большим уровнем гидрофобности центральных участков молекул, так и меньшим объемом гидрофобных поло-

стей. Возможно, в результате более «жесткой» упаковки гидрофобных участков их молекул доступными для окислительной модификации могут быть только поверхностные и прилегающие к ним «рыхлые» слои белковых глобул. Вполне вероятно также, что с увеличением компактности упаковки центральных участков гемоглобинов рыб возрастает объем периферических, наименее гидрофобных и полярных зон белковой глобулы. Это и создает условия для более активной окислительной модификации находящихся в них аминокислотных остатков.

S. V. Konoshenko, A. A. Gidulyanov

Intramolecular structure and oxidative modification of haemoglobin major fractions of some mammalia and fishes representatives

Summary

Phylogenetic particularities of a total volume of hydrophobic cavities and hydrophobicity of molecular central parts of mammalian and fish haemoglobins have been revealed. It has been determined that the vertebrates' haemoglobins undergo oxidative modification in erythrocytes, the level of which is species specific and depends on the protein intramolecular structure. A direct relationship between the total volume of molecular hydrophobic cavities of mammalian haemoglobins and the level of oxidative modification base products has been shown under initiation of the oxidative processes. A reverse relation between corresponding indices has been found for fishes' haemoglobins before initiation of oxidative processes.

С. В. Коношенко, А. О. Гидулянов

Внутрішньомолекулярна структура і окислювальна модифікація головних фракцій гемоглобінів окремих представників ссавців і риб

Резюме

Обговорюються філогенетичні особливості загального об'єму гідрофобних порожнин і ступеня гідрофобності центральних ділянок молекул головних фракцій гемоглобінів окремих представників класу ссавців і класу риб. Встановлено, що гемоглобіни хребетних піддаються окислювальній модифікації в еритроцитах, рівень якої має видову специфічність і певну залежність від внутрішньомолекулярної структури білка. У представників класу ссавців спостерігається прямий зв'язок між загальним об'ємом гідрофобних порожнин молекул гемоглобінів та рівнем продуктів окислювальної модифікації основного характеру, що виявляється в умовах ініціації окислювальних процесів. У представників класу риб виявлено зворотний зв'язок між відповідними показниками гемоглобінів у вихідному стані, до ініціації окислювальних процесів.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурлакова Е. В., Храпова Н. Г. Перекисное окисление липидов мембраны // Успехи химии.—1985.—54, № 9.— С. 1540—1580.
2. Владимиров Ю. А., Оленев В. И., Сулова Т. Б., Потенко А. И. Механизм перекисного окисления липидов и его действие на мембраны. Итоги науки и техники // Биофизика.—1975.—№ 5.—С. 56—60.
3. Кулагин Ю. И., Левачев М. М., Сюрин А. А., Лупинович

- В. А. Перекисное окисление и особенности жирнокислотного состава липидов клеточных мембран у больных гипертонической болезнью // *Вопр. мед. химии.*—1989.—№ 3.—С. 129—132.
4. *Меньшикова Е. Б., Зенков Н. К.* Окислительный стресс при воспалении // *Успехи соврем. биологии.*—1997.—117, № 2.—С. 155—169.
5. *Пескин А. В.* Взаимодействие активного кислорода с ДНК // *Биохимия.*—1997.—62, № 12.—С. 1571—1578.
6. *Дубинина Е. Е., Бурмистров С. О., Ходов Д. А., Поротов И. Т.* Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // *Вопр. мед. химии.*—1995.—41, № 1.—С. 24—26.
7. *Drabkin D.* A simplified technique for large scale crystallization of myoglobin and haemoglobin in the crystalline // *Arch. Biochem.*—1949.—21.—P. 224—226.
8. *Ажицкий Г. Ю., Богдасарьян С. Н.* Возможность выделения мономерного иммунохимически чистого сывороточного альбумина // *Лаб. дело.*—1975.—№ 12.—С. 712—714.
9. *Davis B. J.* Disc electrophoresis. Method and application to human serum proteins // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*—1964.—121.—P. 404—407.
10. *Остоловский Е. М., Боцянский А. Д., Задорожный Б. А.* Исследование структуры сывороточного альбумина млекопитающих методом флуоресцентных зондов // *Биофизика.*—1988.—33, № 2.—С. 350—358.
11. *Измайлова В. Н., Ребиндер П. А.* Структурообразование в белковых системах.—М.: Наука, 1974.—392 с.
12. *Конощенко С. В., Байала Иссо.* Сравнительная характеристика внутримолекулярной подвижности и сродства к кислороду гемоглобинов в ряду позвоночных // *Биополимеры и клетка.*—1994.—10, № 2.—С. 72—74.

УДК 577.121:547.963
Надійшла до редакції 20.12.02