

**ОСОБЕННОСТИ ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ И СРОДСТВА  
К КИСЛОРОДУ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ ФРАКЦИЙ ГЕМОГЛОБИНА  
ДЕЛЬФИНА-АФАЛИНЫ *Tursiops truncatus***

*Осляк Т. В., соискатель кафедры биохимии,  
Акопян Н. А., специализант кафедры биохимии,  
Коношенко С. В., доктор биологических наук, профессор*

Гемоглобин является одним из компонентов системы молекулярных механизмов адаптации, действие которых направлено на поддержание оптимального уровня жизнедеятельности организма в различных условиях существования. Имеющиеся в литературе данные [2,7,10] свидетельствуют о важном приспособительном значении структурно-функциональной гетерогенности гемоглобинов в регуляции кислородного режима у животных. 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, целью настоящей работы явилось изучение общего объема гидрофобных полостей, протеолитической устойчивости и сродства к кислороду электрофоретических фракций гемоглобина дельфина-афалины и определение возможной связи соответствующих параметров внутримолекулярной структуры фракций гемоглобина с их функциональной активностью.

Материалом для исследований служил гемоглобин черноморского дельфина-афалины *Tursiops truncatus*. Кровь брали у 11-ти половозрелых особей, адаптированных к условиям содержания в Государственном Океанариуме Украины (г. Севастополь). Гемоглобин выделяли по [13], гемолизируя эритроциты в присутствии дистиллированной воды. Фракционный состав гемоглобина изучали с помощью диск-электрофореза в 7%-ном ПААГ [12]. Фракции гемоглобина выделяли препаративным электрофорезом в блоках 7%-ного ПААГ [1].

Общий объем гидрофобных полостей молекул гемоглобина исследовали методом солюбилизации углеводорода (бензола) с помощью рефрактометрии на ИРФ-23 при длине волны 589 нм [3]. Объем гидрофобных полостей рассчитывали на основании величины связывания бензола молекулами белка (N; моль/моль) [9]. Протеолитическую устойчивость к трипсину определяли по методу Lee-Va-Pin [8]. Сродство фракций гемоглобина к кислороду изучали путем построения кривых кислородной диссоциации [11], определяя показатели полунасыщения гемоглобина кислородом (P<sub>50</sub>).

Методом диск-электрофореза в 7%-ном ПААГ гемоглобин дельфина-афалины разделяется на

три электрофоретические фракции: две главные (Нв-3 и Нв-2) и одну минорную (Нв-1), соотношение которых составляет 4:5:1, соответственно, а электрофоретическая подвижность к аноду снижается в направлении Нв-1–Нв-2–Нв-3. Изучение общего объема гидрофобных полостей молекул электрофоретических фракций гемоглобина показало, что этот структурный показатель имеет наибольшее значение для Нв-1, а наименьшее – для Нв-2 (табл.1).

Таблица 1

**Солюбилизация бензола фракциями гемоглобина дельфина-афалины**

Фракции гемоглобина	Степень связывания бензола белком (N, моль/моль)
Нв-1	304 + 3
Нв-2	145 + 2
Нв-3	282 + 2

Увеличение общего объема гидрофобных полостей молекул гемоглобина коррелирует с уменьшением их протеолитической устойчивости, о которой мы судили по величине начальной скорости гидролитического расщепления белка трипсином ( $tg\alpha$ , где  $\alpha$  - угол наклона начального участка кривой гидролиза). Так, оказалось, что минорная фракция Нв-1, характеризующаяся наибольшим объемом гидрофобных полостей, лучше других фракций подвергается гидролитическому воздействию фермента (табл.2).

Таблица 2

**Начальная скорость триптического протеолиза ( $tg\alpha$ ) и сродство к кислороду ( $P_{50}$ ) фракций гемоглобина дельфина-афалины**

Фракции гемоглобина	Скорость протеолиза, $tg\alpha$	$P_{50}$ , мм рт.ст.
Нв-1	1,73 + 0,05	28 + 0,9
Нв-2	0,70 + 0,01	22 + 1,1
Нв-3	1,43 + 0,03	26 + 0,8

Основываясь на представлениях о взаимосвязи общего объема гидрофобных полостей белковых молекул с жесткостью их структуры [9], можно предположить, что молекулы гемоглобинов с большим объемом гидрофобных полостей менее плотно упакованы и, возможно, это является одной из главных причин их меньшей протеолитической устойчивости.

Из трех электрофоретических фракций гемоглобина дельфина главная фракция Нв-2 характеризуется наиболее высоким сродством к кислороду. Величина  $P_{50}$  данной фракции составляет 26+0,8 мм рт.ст. и находится в пределах значений, характерных для главных фракций гемоглобинов млекопитающих [5,6]. Минорная фракция Нв-1 проявляет наиболее низкое сродство к кислороду.

Наблюдается хорошо выраженная взаимосвязь параметров внутримолекулярной структуры фракций гемоглобина с их сродством к кислороду: фракции с меньшим сродством к кислороду ха-

рактируются большим объемом гидрофобных полостей и меньшей протеолитической устойчивостью.

Эти данные подтверждают результаты предыдущих исследований, полученные при изучении гемоглобинов отдельных представителей позвоночных [4-6], а также позволяют прийти к выводу о возможности коррелирующего влияния "жесткости" структуры белковых молекул на R-T – конформационный переход при дезоксигенации гемоглобина.

#### **Литература.**

1. Ажицкий Г.Ю., Багдасарьян С.Н., Возможность выделения мономерного иммунохимически чистого сывороточного альбумина // Лаб.дело.,1985. - N12.-С.712-714.
2. Дударев В.П., Роль гемоглобина в механизмах адаптации к гипоксии и гипероксии. Киев: Наукова думка, 1979.- 150 с.
3. Измайлова В.Н., Ребиндер П.А., Структурообразование в белковых системах. М: Наука, 1974. - 329 с.
4. Коношенко С.В., Внтримолекулярная подвижность и сродство к кислороду гемоглобинов среднеазиатской черепахи *Testudo horsfieldi* и ужа водяного *Natrix tessellata* // Биополимеры и клетка., 1993. - С.47-50.
5. Коношенко С.В., Байала Иссо , Сравнительная характеристика внутримолекулярной подвижности и сродства к кислороду гемоглобинов в ряду позвоночных // Биополимеры и клетка., 1994. - 10, N2. - С. 72-74.
6. Коношенко С.В., Абдель Рахман, Сравнительная характеристика некоторых физико-химических и структурно-функциональных свойств гемоглобина в ряду позвоночных //Журн. эволюц. биохим. и физиол., 1994. - 30, N5. - С. 683-689.
7. Лукьяненко В.И., Васильев А.С., Лукьяненко В.В., Гетерогенность и полиморфизм гемоглобина рыб. С.-Петербург:Наука, 1991. - 392 с.
8. Мысак В.Я. Физико-химические свойства и химическая структура тропомиозина мышц, облученных гамма лучами. Автореф. дисс. ... к.б.н., Львов, 1969.
9. Остоловский Е.М., Бодянский А.Д., Задорожный Б.А., О внутримолекулярной структуре сывороточного альбумина млекопитающих // Биофизика, 1990. - 35,N5. - С. 762-764.
10. Стародуб Н.Ф., Гетерогенная система гемоглобина. Структурные особенности, физико-химические и функциональные свойства отдельных форм гемоглобина и их роль в биохимической адаптации организма к условиям жизни. // Успехи совр. биологии, 1985. - 99, вып. 3. - С. 385-400.
11. Шорохов Ю.А., Спектрофотометрический метод определения кривой диссоциации оксигемоглобина в кювете десатуратора // Физиол. журн., 1974. - LX, N4. - С. 654-657.
12. Davis B., Disk electrophoresis II. Method and application to human serum proteins // Ann. N.Y.Acad.Sci., 1964. - 121, N 11. - P. 404-406.
13. Drabkin D.A., Simplifide technique for large scale crystallization of haemoglobin in the cristalline // Arch.biochem.,1949. - 21, N5. - P. 242-249.