

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА МАКРОМОЛЕКУЛ И ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СОСТОЯНИЯХ ОРГАНИЗМА

Толкачева Н.В., Коношенко С.Н., Мартынюк В.С., Залевская И.Н., Гемберг О.П.,  
Лысенко И.Н., Бабусайли Абдулла, Абдель Рахман Эльтахир

Исследование молекулярных и метаболических механизмов адаптационных реакций организма животных и человека в ответ на действие разнообразных факторов среды является одной из важнейших проблем современной экологической биохимии, физиологии и медицины. В последнее время большое внимание уделяется вопросам индивидуальной реактивности и устойчивости организмов по отношению к факторам внешней среды. Общеизвестно, что характер адаптационных реакций определяется физиологическим состоянием организма (норма, стресс, патология), а также индивидуально-типологическими особенностями ЦНС, эндокринной регуляции, состояния определенных стресслимитирующих механизмов, важным звеном которой является антиоксидантная система [1,5] и состояния основного метаболизма клеток и тканей. Метаболическая ситуация, в свою очередь, определяет характер активации генов [5,6] и посттрансляционных модификаций белковых молекул, что отражается на их структурно-функциональных свойствах [11]. Одним из звеньев биохимической адаптации при указанных состояниях организма является альбумин, выполняющий важную роль в транспорте разнообразных экзогенных и эндогенных соединений и их регуляции в русле крови. В системе теоретических и практических проблем, раскрывающих характер молекулярных повреждений этого белка, особое значение имеют исследования, начатые в 50-е годы Г.В.Троицким [10]. Впервые высказанное им предположение о постсинтетической модификации молекул альбумина нашло свое подтверждение в дальнейших работах Д.А.Соркиной, Г.Ю.Ажицкого, С.Н.Борисенко, Н.В.Толкачевой и других авторов [8,9,12].

Не менее важным направлением молекулярной биологии является изучение физико-химических и структурно-функциональных особенностей физиологически активных молекул, а также молекулярно-адаптационных механизмов в эволюционном аспекте. Решение проблем сравнительной биохимии требует все большего внимания исследователей к изучению гомологичных белков, выполняющих одинаковую функцию в разных организмах [4, 16, 17]. Гемоглобин, наряду с другими биополимерами, является одним из объектов филогенетического анализа.

Таким образом, изучение структурно-функциональных свойств макромолекул и состояния метаболических процессов при разнообразных физиологических состояниях в зависимости от индивидуально-типологических особенностей организма является актуальной задачей современной экспериментальной биологии и медицины.

В настоящих исследованиях для оценки структурно-функциональных свойств белков и метаболических процессов были использованы электрофоретические, хроматографические, иммуно-химические, спектральные методы (КД, ДОВ, ДТПС, ИК- и флуоресцентная спектроскопия), а также сканирующая микрокалориметрия, ЯМР-релаксация, спектрофотометрический метод построения кривых кислородной диссоциации оксигемоглобинов, энзиматические методы.

Нами проведен анализ связи физиологических показателей с состоянием ПОЛ, ТДО и отдельными показателями энергетического обмена в крови, а также головном мозге животных в норме.

Как известно [7], индивидуально-типологические особенности организма животных можно быстро и надежно оценить с помощью метода "открытого поля". Суть метода заключается в том, что помещение животного в новое окружение инициирует исследовательское поведение, которое в то же время подавляется эмоцией страха. В зависимости от типологических особенностей ЦНС две указанные антагонистические тенденции у животных проявляются по-разному. Одни демонстрируют более высокую ориентировочно-исследовательскую реакцию, другие - более выраженную реакцию страха и тревоги.

В многочисленных исследованиях установлено, что животные с низким уровнем ориентировочно-исследовательского поведения в "открытом поле" характеризуются низкой стрессоустойчивостью, низкими порогами чувствительности к действию стресс-факторов, низкой уравновешенностью нервных процессов, более высокой отрицательной эмоциональностью. Животные, проявляющие высокое исследовательское поведение в "открытом поле", имеют, как правило, противоположные качества.

В наших исследованиях установлена достаточно выраженная связь метаболических процессов в головном мозге и плазме крови с характером исследовательского поведения животных, а, следовательно, и с типом ЦНС.

Для животных с низкой исследовательской активностью характерны высокие уровни содержания продуктов перекисного окисления липидов и тиоловых групп в коре больших полушарий, низкие значения данных показателей в гипоталамусе, высокая активность сукцинатдегидрогеназы и низкая - NADH-дегидрогеназы и моноаминоксидазы.

У животных с высоким уровнем ориентировочно-исследовательского поведения имеет место противоположная метаболическая ситуация, которая характеризуется более низким уровнем содержания продуктов перекисного окисления липидов и суммарных тиоловых групп в коре больших полушарий, низкой активностью сукцинатдегидрогеназы и высокой активностью NADH-дегидрогеназы и моноаминоксидазы.

В крови у экспериментальных животных уровень исследовательской активности отрицательно коррелирует с содержанием суммарных тиоловых групп и конечных продуктов свободнорадикального окисления и положительно - с концентрацией липидов. Следует отметить, что в экспериментах, проведенных на цыплятах породы Белый Корниш, было установлено, что уровень содержания суммарных тиоловых групп сыворотки крови сильно варьирует в популяции и отрицательно коррелирует с уровнем конверсии корма. Сопоставление результатов, полученных на лабораторных животных и на домашней птице, позволяет установить причинно-следственные связи между типом ЦНС, нейроэндокринной регуляцией, стрессоустойчивостью, характером метаболизма и уровнем конверсии корма. Согласно нашим данным, животные с низкой конверсией корма характеризуются слабой, неуравновешенной нервной системой и низкой стрессоустойчивостью.

Таким образом, экспериментальные факты свидетельствуют о глубоких причинно-следственных связях метаболических процессов, протекающих в различных тканях организма, с типом высшей нервной деятельности. Применение типологического подхода для метаболических процессов позволит существенно расширить и систематизировать современные представления о механизмах формирования разнообразных физиологических состояний, а также разрабатывать системы прогнозирования индивидуальной чувствительности и реактивности животных и человека в ответ на действие разнообразных факторов среды. В то же время оценка индивидуально-типологических особенностей метаболических процессов может быть полезной в селекционной практике с целью выявления животных с ценными хозяйственными признаками.

Для изучения структурно-функциональных свойств альбумина при различных физиологических состояниях обследованы спортсмены разной квалификации (МСМК, МС, 1-й разряд), выполнявшие физическую нагрузку различной мощности и больные с заболеваниями сердечно-сосудистой системы и злокачественными новообразованиями.

Определение содержания общих липидов в составе сывороточного альбумина (СА) позволило установить их стационарные концентрации у здоровых лиц и выявить масштаб изменений в условиях меняющихся метаболических ситуаций в достаточно широких пределах (от 2.3 мг/100 мг белка до 11.0 мг/100 мг белка).

Качественный анализ фракционного состава липидов выявил такие фракции как ФЭА, ФИ, ЛФ, СМ, что не исключает возможности компенсаторного включения альбумина крови в процессы обменяемости липидов в мембранах липопротеинов, что, возможно, свидетельствует о функционировании системы транспортных белков.

В регуляции многочисленных функций организма, как известно, особое значение имеют ПНЖК. В последние годы чрезвычайно возрос интерес к изучению биологических свойств ПНЖК семейства  $\omega 3$ . В ряде публикаций показано их положительное влияние в качестве

фактора, снижающего риск сердечно-сосудистых заболеваний, их гипохолестеринемическое и гипотензивное действие, способность снижать агрегацию тромбоцитов, удлинять время свертывания крови [13, 14]. В исследованиях, проведенных на животных, показана способность жирных кислот  $\omega^3$  подавлять рост опухолей, что связывают с возможным их действием на биосинтез простагландинов [15]. Нами выявлены определенные закономерности в содержании ПНЖК этого семейства у онкологических больных. Установлен факт увеличения жирных кислот  $\omega^3$  при онкопатологии гепато-дуоденальной зоны на поздних стадиях развития заболевания, рассматриваемый нами как проявление неспецифических защитных реакций организма. В то же время при изучении жирнокислотного состава СА у больных раком легких и молочной железы показано снижение ПНЖК  $\omega^3$  на начальных стадиях развития злокачественной опухоли, что свидетельствует о возможности использования данного показателя как диагностического теста.

Одним из путей превращения жирных кислот является их включение в реакции перекисного окисления липидов. До настоящего времени все еще остаются малоизученными вопросы, касающиеся метаболизма, транспорта и непосредственного участия альбумина в процессах ПОЛ. Нами показано, что альбумин сыворотки крови практически здоровых лиц связывает некоторое количество эндогенных перекисей. Общей закономерностью в лигандировании продуктов ПОЛ СА при различных состояниях организма явилось повышение активности белка в их транспорте. У спортсменов различной специализации под влиянием физической нагрузки отмечалось снижение уровня продуктов ПОЛ, что согласно существующим представлениям рассматривается как благоприятный диагностический признак. Полученные результаты не исключают возможности активного использования гидроперекисей в качестве дополнительного источника энергии по иному механизму, отличному от пути  $\beta$ -окисления жирных кислот. Следует отметить значительно более высокое содержание эндогенных перекисей в альбуминовом комплексе больных циррозом и злокачественными опухолями различной локализации по сравнению с заболеваниями сердечно-сосудистой системы. Различный масштаб реагирования СА на интенсивность процессов ПОЛ сочетается с уменьшением у этих больных доли арахидоновой кислоты, которая, как известно, является основным субстратом для ПОЛ.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о резко выраженной "перегруженности" молекул СА различными лигандами, что несомненно должно отражаться на их конформационном состоянии. Методами спектрального и флуоресцентного анализа было проведено изучение СА онкологических больных. Полученные данные подтверждают имеющиеся представления о конформационной изменчивости молекул альбумина при патологии, что выражается в уменьшении количества спиральных структур и доступных пертурбации тирозилов, а также поверхностно-ориентированных и более глубоких зон сорбции АНС и ФНА, соответственно [8,9,12]. Оценка резервной функциональной активности (РФА) и термостабильности СА онкобольных (рак молочной железы и легких) выявила явно выраженную динамику этих показателей в зависимости от характера и степени тяжести заболевания. Так, РФА альбумина снижалась до 52.8% при раке молочной железы и 29.4% при раке легких у больных с четвертой стадией развития опухоли. Результаты дифференциальной сканирующей микрокалориметрии показали резкое снижение удельной энтальпии денатурации на начальных этапах патологического процесса. В то же время при воздействии регулярных физических нагрузок выявлены лишь локальные конформационные изменения в области неупорядоченных структур.

Для оценки филогенетических особенностей структурных и функциональных свойств гемоглобинов позвоночных в качестве объектов служили половозрелые особи 13-ти представителей шести классов позвоночных: человека, быка, свиньи, тюленя, голубя, кур, водяного ужа, травяной лягушки, серой жабы, кефали-сингиль, карпа, толстолоба и речной миноги.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что подавляющее большинство изученных гемоглобинов у представителей различных классов позвоночных являются гетерогенными и разделяются методом электрофореза в 7%-ном ПААГ на две и большее количество фракций. Наблюдается тенденция снижения относительной электрофоретической подвижности гемоглобинов в ряду позвоночных от круглоротых и рыб к млекопитающим.

Изучение сродства к кислороду электрофоретических фракций гемоглобинов позволило установить различия в состоянии их функциональной активности. Наиболее высоким сродством к кислороду отличаются главные фракции гемоглобинов миноги и представителей класса рыб. В характере изменений сродства гемоглобинов к кислороду прослеживается определенная закономерность: снижение сродства к кислороду при переходе от низших филогенетических групп позвоночных к высшим. Наиболее значительные изменения наблюдаются при переходе от класса рыб к классу земноводных, а также от земноводных и пресмыкающихся к классу птиц.

Дальнейшее изучение внутримолекулярной структуры гемоглобинов методами ЯМР-релаксации и флуоресцентного анализа позволило установить филогенетические различия гемоглобинов в уровне внутримолекулярной подвижности, степени гидрофобности и в плотности упаковки различных областей белковой глобулы. Показано, что в процессе филогенеза осуществлялось закономерное увеличение внутримолекулярной подвижности гемоглобина и, вместе с тем, уменьшение плотности упаковки центральных участков молекулы.

На основании результатов флуоресцентного анализа можно сделать предположение о том, что на изменения внутримолекулярной структуры гемоглобина, которые осуществлялись в процессе эволюции, накладывались определенные ограничения.

Центральные области молекулы гемоглобина претерпевали более жесткие ограничения в размерах и степени гидрофобности, что должно быть принципиально важным для поддержания пространственной структуры молекулы и ее оптимального функционирования. Периферийные области молекулы гемоглобина претерпевали более жесткие ограничения в плотности упаковки, что также могло иметь большое значение для сохранения общей структурной организации каждой из субъединиц. Менее жесткие ограничения в плотности упаковки претерпевали центральные области молекулы гемоглобина. Для этих областей большее значение имеет сохранение оптимальных размеров и степени гидрофобности, что согласуется с имеющимися в литературе представлениями [2, 3]. Вместе с тем можно предположить, что более выраженные изменения в плотности упаковки в центральных областях молекулы гемоглобина (неполярное "ядро" каждой из субъединиц, гидрофобная полость между субъединицами в тетрамере) могут быть одной из причин видовых различий гемоглобинов в уровне внутримолекулярной подвиж-

ности,  $R \rightleftharpoons T$  - конформационного переходов и в функциональной активности. Можно также предположить, что определенные структурные блоки белковой молекулы, в формировании которых заняты преимущественно гидрофобные аминокислотные остатки, в основном сформировались на раннем этапе эволюции гемоглобина. Дальнейшие, даже незначительные изменения гидрофобных участков белковой молекулы в процессе филогенеза могли способствовать совершенствованию структурно-функциональных свойств гемоглобина.

Филогенетические особенности внутримолекулярной структуры гемоглобинов прослеживаются в различиях общего объема гидрофобных полостей (солюбилизация бензола растворами гемоглобинов) и в количестве титруемых поверхностных тирозилов. Отмечена взаимосвязь в характере изменений общего объема гидрофобных полостей белковой молекулы и плотности ее центральных областей. При переходе от низших филогенетических групп позвоночных к высшим снижается микровязкость зон сорбции ФНА и увеличивается общий объем гидрофобных полостей, что в целом свидетельствует о снижении компактности упаковки белковых глобул. Возможно, это и является основной причиной увеличения внутримолекулярной подвижности гемоглобинов в ряду позвоночных от круглоротых до птиц и млекопитающих.

Очевидно, в процессе филогенеза осуществлялось неравномерное развитие внутримолекулярной структуры и функциональных свойств гемоглобина, в результате которого изменение кислородо-транспортных свойств гемоглобина, вероятно, шло в направлении повышения его эффективности на этапе разгрузки в тканях, что должно было иметь определенное физиологическое значение.

Таким образом, развитие эволюционных представлений о формировании структуры и функции гемоглобинов дает возможность лучше понять основы молекулярных адаптаций в филогенезе и определить закономерности, связанные с развитием внутримолекулярных взаимо-

действий как в гемоглобине, так и в других физиологически важных белках. В частности, адаптационные характеристики структурно-функционального состояния альбумина в различных метаболических ситуациях могут иметь важное значение в изучении альбумин-рецепторных взаимодействий, транслокации лигандов через клеточные мембраны, диссоциации лигандальбуминовых комплексов и катаболизма этого белка. Решение указанных проблем позволит существенно расширить и систематизировать современные представления о молекулярных и метаболических механизмах формирования разнообразных физиологических состояний, а также разрабатывать системы прогнозирования индивидуальной чувствительности и реактивности животных и человека в ответ на действие разнообразных факторов среды. И хотя в течение последних лет уже появились работы такого характера, предстоит углубленное развитие этих проблем как одной из важнейших задач современной молекулярной биологии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах - М.:Наука,1972. - 252 с.
2. Волькенштейн М.В. Биополимеры и эволюция // Мол. биология - 1985. - Т.19, вып. 1. - С. 55-66.
3. Кимура М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности. -М.: Мир. - 1985. - 398 с.
4. Крепс Е.М. Об эволюции морфофизиологической и эволюции биохимической //Журн. эвол. биохим. и физиол. - 1976. -Т.12, 7 \_0N 6. - С. 493-522.
5. Меерсон Ф.З. Адаптация к стрессорным ситуациям и стресслимитирующие системы //Руководство по физиологии адаптационных процессов. М.:Наука, 1986.-640 с.
6. Меерсон Ф.З., Малышев И.Ю. Феномен адаптационной стабилизации структур и защита сердца. - М.:Наука, 1993. - 159с.
7. Симагин В.Н., Зухарь А.В., Куликов М.А. Тип нервной системы, стрессоустойчивость и репродуктивная функция. - М.: Наука,1988. - 135 с.
8. Соркина Д.А. Конформационные изменения белков сыворотки в процессе выполнения ими транспортной функции //Вопр.мед.химии. - 1967. - Т.13. - N 3. - С. 263-270.
9. Толкачева Н.В., Левачев М.М., Кулакова С.Н. и др. Структурно-функциональная оценка СА при онкологических заболеваниях //Вопр. онкол.-1991.-N 3.-С. 293-297.
10. Троицкий Г.В. Изменение белков крови животных в процессе выполнения ими транспортной функции //Тез.5 съезда Укр.общества физиологов, биохимиков и фармакологов. - Киев., 1956. - С. 320-321.
11. Троицкий Г.В. Постсинтетическая модификация белков при патологии. //Укр.биохим.журн. -1987. -Т.59. - N 2. -С. 91-117.
12. Троицкий Г.В., Ажицкий Г.Ю., Багдасарьян С.Н., Толкачева Н.В. Изменения структуры и изменчивость сывороточного альбумина в норме и при патологии //Мол. биол. - 1976. - N 12. - С. 89-98.
13. Gueriquion J.L. Prostaglandin macromolecule interactions. //J. Pharmacol. and Exp. Ther.-1976.-V.2.-P.391-401.
14. Lands W.E.M. Renewed questions about polyunsaturated fatty acid //Nutr.Rev. -1986.-V.44,N 6.-P. 189-195.
15. Karmali R.A., March J., Fusch C. Effect of  $\omega$ -3 fatty acids on growth of a rat mammary tumor //J. NCI. - 1884.-V.73. - P. 457-461.
16. Kimura M. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences //Proc.Natl.Acad.Sci.USA - 1981. - V.78. - P. 454-458.
17. Zuckerkandl E. The appearance of new structures and functions in proteins during evolution //J.Mol. Evol. -1975. -V.7, 7 \_0N 1. - P. 1-57.