

3. Выводы.

Проведенная работа и анализ информационных источников позволяет классифицировать, как любой из методов измельчения, так и технологическое оборудование для его реализации. Кроме того, следует сделать выводы:

1. Конструктивно-технологические параметры решетных молотковых дробилок (основных машин для измельчения на сегодня) достаточно изучены и значительное повышение эффективности их работы – исчерпано.

2. В существующих конструкциях молотковых дробилок удаление продукта измельчения через сита требуют дополнительных затрат энергии, качество продукта обусловлено сменными ситами.

3. Теории по измельчению не позволяют дать точное математическое описание сложным процессам, тем не менее, могут содействовать при создании новых, улучшенных образцов машин.

4. Наиболее рациональным, с точки зрения энергоемкости процесса и компактности конструкции машины, является комбинированное измельчение в ограниченной рабочей зоне.

Список литературы: 1. Касаткин А. Г. Основные процессы и аппараты химической технологии // Химия, М., 1971, 2. Сиденко П. М. Измельчение в химической промышленности // Химия, – М., 1979, 3. Шакдыров П. И. Обоснование параметров многоступенчатой дробилки. // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук, – Челябинск, 1984, 4. Кочеткова А. А., Звягинцев Л. Т. Влияние параметров молотковой дробилки на эффективность ее работы. – В кн.: Хранение и переработка зерна. Вып. 1. – М.: ЦНИИТЭМ Минзага СССР, 1972, с. 29-31, 5. Клименко Н. И. Исследование основных параметров молотковой дробилки с внутренним вентилятором для измельчения зерновых кормов: Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук, – К., 1972, 6. Плохов Ф. Г. Использование динамики рабочего процесса молотковой дробилки замкнутого типа: Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук, – Ленинград-Пушкин, 1966, 7. Шуб Г. И. Исследование технологического процесса измельчения сырья комбикормового производства на молотковой дробилке: Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук, – Целиноград, 1966, 8. Леонтьев П. И. Малаев М. Д. Центробежная дробилка зерна. – Челябинск, 1982. (Челябинский ЦНТИ. Информационный листок №265-82)

Поступила в редколлегию 10.01.08

УДК 612.111.1

РОЗАНОВА Е.Д., канд. биол. наук, ТИМЧЕНКО Н.Н., канд. биол. наук.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СТРУКТУРЕ И СВОЙСТВАХ ФЕТАЛЬНОГО ГЕМОГЛОБИНА И ГЕМОГЛОБИНА А.

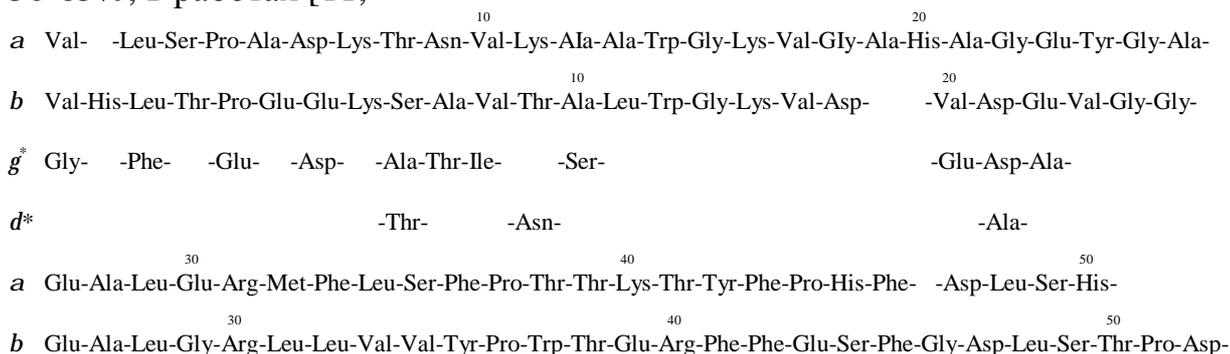
Розглядається структура фетального (від лат. fetus – плодовий) гемоглобіну та гемоглобіну А (від лат. adultus – дорослий). Гемоглобін А містить два α - і два β -поліпептидні ланцюга, а фетальний гемоглобін по два α - і γ -ланцюга. У фізіологічних умовах фетальний гемоглобін має підвищену спорідненість до кисню порівняно з гемоглобіном А. Фетальний гемоглобін у 100-150 разів більш стійкий до денатуруючої дії луку порівняно з НbА,

HbF називають лужно-стійким; ембріональні гемоглобіни ще більш резистентні. Вміст фетального гемоглобіну в крові збільшується при патологічних станах організму.

Возможное применение фетального гемоглобина и гемоглобина А в медицине влечет за собой необходимость их длительного хранения. Ранее исследовалось повреждение белков при замораживании [1], и в настоящее время эта тема остается актуальной [2-4]. Важно исследовать свойства фетального гемоглобина и гемоглобина А, что поможет формированию теоретической базы для их возможного применения в медицине.

Молекула гемоглобина (молекулярная масса 64500) состоит из четырех полипептидных цепей, связанных с молекулой гема [5-7]. Строение некоторых полипептидных цепей гемоглобина изменяется в процессе онтогенеза, но независимо от типа и периода синтеза, большинство молекул гемоглобина имеют две одинаковые полипептидные цепи - α -цепи, а две другие цепи могут отличаться, что и определяет тип молекулы гемоглобина. Эмбриональные гемоглобины присутствуют в течение первых двух месяцев гестации: гемоглобин Portland [8, 9]; Gower I, состоящий из четырех гемов и четырех ϵ -цепей и Gower II, имеющий две α - и две ϵ -цепи [9-12]; эмбриональный гемоглобин, состоящий из двух ξ - и двух ϵ -цепей [6]. Эмбриональные гемоглобины замещаются фетальным гемоглобином (HbF), который имеет две α - и две γ -цепи [5, 10] (рис. 1).

На протяжении остального эмбрионального периода жизни после двух месяцев гестации не только происходит преимущественный синтез γ -цепей, вследствие чего преобладает фетальный гемоглобин (HbF, от лат. fetus – плодовой), но и, по-видимому, γ -цепи присутствуют в некотором избытке по сравнению с α -цепями. Эти избыточные γ -цепи соединяются и образуют тетрамер γ_4 - гемоглобин Барта, который в норме присутствует только в виде следов, его называют быстрым гемоглобином из-за его электрофоретической подвижности [10]. Еще во внутриутробном периоде начинается синтез β -полипептидных цепей, которые в комбинации с α -полипептидными цепями входят в состав гемоглобина А (HbA, от лат. adultus - взрослый) с двумя α - и двумя β -цепями [12]. После рождения начинает преобладать гемоглобин дефинитивного типа. Большинство типов дефинитивного гемоглобина содержит, помимо двух α -цепей, две β - или две δ -цепи [5]. ϵ -цепь похожа на β - и γ -цепи, однако ее полная аминокислотная последовательность еще не определена, ξ -цепь сходна с α - цепью [6]. Последовательности аминокислот α -, β -, γ - и δ -цепей приведены в [6]. Структуры гемоглобинов А и F различны (рис. 2, 3). В пуповинной крови новорожденного количество фетального гемоглобина составляет по данным [10] 50-65%, в работах [11,



g -Thr- -Asp- -Ser-Ala-Ser-
d -Ser-
a -Gly-Ser-Ala-Glu-Val-Lys-Gly-His-Gly-Lys-Lys-Val-Ala-Asp-Ala-Leu-Thr-Asn-Ala-Val-Ala-His-Val-Asp-
b Ala-Val-Met-Gly-Asp-Pro-Lys-Val-Lys-Ala-His-Gly-Lys-Lys-Val-Leu-Gly-Ala-Phe-Ser-Asp-Gly-Leu-Ala-His-Leu-Asp-
g -Ile- -Thr-Ser-Leu-Gly- -Ala-Ile-Lys-
a Asp-Met-Pro-Asp-Ala-Leu-Ser-Ala-Leu-Ser-Asp-Leu-His-Ala-His-Lys-Leu-Arg-Val-Asp-Pro-Val-Asp-Phe-Lys-Leu-Leu-
b Asp-Leu-Lys-Gly-Thr-Phe-Ala-Thr-Leu-Ser-Glu-Leu-His-Cys-Asp-Lys-Leu-His-Val-Asp-Pro-Glu-Asn-Phe-Arg-Leu-Leu-
g -Glu- -Lys-
d -Ser-Gln-
a Ser-His-Cys-Leu-Leu-Val-Thr-Leu-Ala-Ala-His-Leu-Pro-Ala-Glu-Phe-Thr-Pro-Ala-Val-His-Ala-Ser-Leu-Asp-Lys-Phe-
b Gly-Asp-Val-Leu-Val-Cys-Val-Leu-Ala-His-His-Phe-Gly-Lys-Glu-Phe-Thr-Pro-Pro-Val-Gln-Ala-Ala-Tyr-Gln-Lys-Val-
g -Thr- -Ile- -Glu- -Ser-Tyr- -Met-
d -Arg-Asn- -Gln-Met-
a Leu-Ala-Ser-Val-Ser-Thr-Val-Leu-Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg
b Val-Ala-Gly-Val-Ala-Asp-Ala-Leu-Ala-His-Lys-Tyr-His
g -Thr- -Ser- -Ser-Ser-Arg-

Рис. 1. Последовательность аминокислот *a*-, *b*-, *g*- и *d*-цепей гемоглобина человека (приведена полная последовательность *a*- и *b*-цепей; у *g*- и *d*-цепей приведены только те остатки, которые отличаются от соответствующих остатков *a*- и *b*-цепей) [6].

13] указано количество 60-80% от общего гемоглобина. Автор [10] приводит данные об относительном количестве HbF после рождения, снижающемся в циркулирующей крови до 5% к 3 месяцу и до уровня меньше 2% - к 3 годам. В работе [11] говорится, что к двенадцатому месяцу постнатального развития.

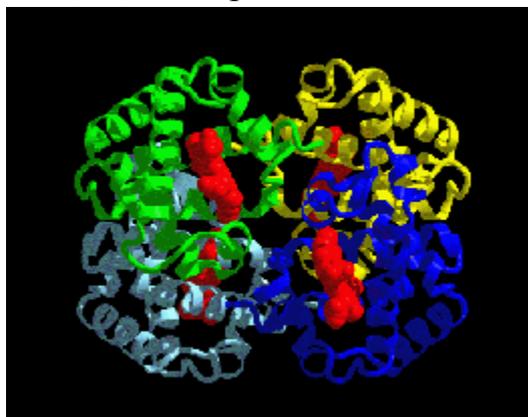


Рис. 2. Структура гемоглобина А.

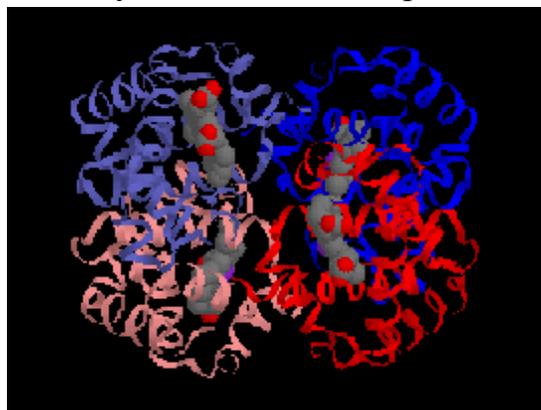


Рис. 3. Структура фетального гемоглобина.

уровень HbF достигает 0,5-3%, что принято за норму для здорового взрослого человека, хотя по некоторым данным [14] повышение его содержания в крови до 4-6% не является еще признаком патологии. В нормальном гемоглобине взрослых имеются две α -цепи из 141 аминокислот и две β -цепи из 146 аминокислот каждая. HbA и HbF различаются по не α -цепям из 146 аминокислот [10, 12]. В работе [12] отмечено, что γ -субъединицы HbF отличаются от β -субъединиц HbA по 39 аминокислотам. В работах [6,15] приведены данные об отличающихся 37 аминокислотах.

По сравнению с HbA, фетальный гемоглобин в физиологических условиях обладает повышенным сродством к кислороду вследствие более слабого связывания 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ), причем такого различия не наблюдается при отсутствии в среде данного лиганда [6, 7]. Установлено, что влияние 2,3-ДФГ на сродство HbF к кислороду составляет около 40% от влияния на HbA; $\log P_{50}$ чистого раствора HbA при добавлении физиологической концентрации 2,3-ДФГ возрастает в 1,73 раза, а раствора HbF - в 1,02 раза [15].

HbF менее стоек к окислению кислородом воздуха, вследствие чего легче превращается в метформу, что обусловлено, вероятно, недостатком двух (по сравнению с HbA) реактивных SH-групп [11]. Также HbF окисляется с большей скоростью, чем HbA, феррицианидом калия, что было установлено при исследовании HbF детей периода новорожденности [16].

Фетальный гемоглобин в 100-150 раз устойчивее к денатурирующему действию 1/12 N раствора щелочи (KOH или NaOH) по сравнению с HbA. HbF называют щелочно-устойчивым, или щелочно-резистентным [12]; эмбриональные гемоглобины еще более резистентны [10]. Тест денатурирования щелочью по Singer основан на резистентности к денатурированию в течение одноминутной экспозиции с указанным раствором при 30°C [10]. Гемоглобин крови взрослых при этом быстро превращается в коричневый гематин, в то время как HbF остается ярко-красным значительный период времени. Структурные основы этого различия в свойствах не ясны [6]. HbF в 2,5-3 раза устойчивее и к соляной кислоте [12], но более чувствителен к высокой температуре.

Изоэлектрическая точка оксигемоглобина A равна 6,87, дезоксигемоглобина A - 6,68 [12], в работе [11] дано значение pI для HbA равное 7,13, а для HbF изоэлектрическая точка выше, чем для HbA и равна 7,22.

В работе [16] при исследовании свойств HbF новорожденных установлено, что фетальный гемоглобин обладает повышенной растворимостью в концентрированных солях (сернокислый аммоний); HbF менее растворим, чем HbA в лимонно-фосфатном буфере с pH 3, 4, что используется для обнаружения его в мазках крови [11].

В эритроцитах новорожденных также обнаружено повышенное содержание карбоксигемоглобина и метгемоглобина (MetHb) по сравнению с последующими возрастными группами [16].

Антоненко В.Т. с соавтором [15], ссылаясь на работу [17], описывает особенности связывания кислорода фетальным гемоглобином, имеющие физиологическое значение для плода: "в результате газообмена с материнской кровью pH в вене пуповины изменяется от 7,24 до 7,32, обеспечивая сдвиг влево

КДО и связывание O_2 внутриэритроцитарным HbF, обладающим повышенным сродством к нему. И, наоборот, при протекании крови в тканевых капиллярах плода имеет место сдвиг рН в кислую сторону, но благодаря повышенному эффекту Бора в условиях низкой артериовенозной разности по O_2 HbF дополнительно освобождает от 19 до 38% кислорода". На основании результатов работ [18,19] автором [15] отмечено, что "характер диссоциации HbO₂ крови плода имеет адаптивное значение, обеспечивая переход O_2 через плацентарный барьер и утилизацию его в тканях". Таким образом, автор [15] считает возможным рассматривать встречающиеся в литературе данные об увеличенном содержании HbF при вторичных тканевых гипоксиях и гипоксических состояниях различной этиологии в качестве компенсаторного явления, которое обуславливает устойчивость организма к гипоксии и негативному влиянию эндогенных факторов.

Повышенное содержание HbF при ряде патологических состояний описано во многих работах [13,20-23]. Авторы [13, 15,21] обнаружили увеличение фракции HbF в условиях гипоксической гипоксии и высказывают предположение об участии HbF в адаптации организма к гипоксии. Роль и причины увеличения содержания HbF точно не установлены. В работе [23] говорится об относительном и абсолютном содержании HbF, обычно повышенном при некоторых наследственных гемоглобинопатиях, анемиях (кроме железодефицитной, при которой оно понижено), при лейкомиях, а также при гипоксии.

Антоненко В.Т. с соавторами [20], рассматривая увеличение содержания HbF как компенсаторное явление при длительной гипоксической гипоксии, провели исследования по определению содержания HbF при тканевой и гемической гипоксии: крыс и морских свинок помещали в затравочные камеры, содержавшие органические соединения ртути (метилэтимеркурацетат, фенилмеркуробромид) - при этом в крови животных HbF увеличен был в 10 раз. Также авторы [20] отмечают повышенное содержание HbF у больных бронхиальной астмой, лейкозом, хронической алкогольной интоксикацией.

Было исследовано влияние органических растворителей (одноатомных спиртов и формамида) на сродство к O_2 HbA и HbF, лишенных фосфатов [24]. Подтверждено, что в HbF равновесие T- (дезоксигем) и R- (оксигем) конформации смещено в сторону T-конформации больше, чем в HbA. По мнению авторов это указывает на то, что способствуют этому увеличенные электростатические и гидрофобные взаимодействия белок-растворитель.

Изучена динамическая структура HbA и HbF с помощью анализа спектров ЭПР спин-меченых HbA и HbF [25]: обнаруженное сильное ограничение движения малеимидной спин-метки отражает движение всей макромолекулы и небольшие различия динамической структуры между HbA и HbF. С другой стороны отмечено, что динамическое равновесие йодацетамидной спин-метки указывает на значительные различия между гибкостью C-концов β - и γ -цепей. Gantchev T. с соавторами [25] отмечают, что состояния α,β и α,γ межсубъединичных контактов различаются, что, по их мнению, может соответствовать индивидуальному сродству к O_2 HbA и HbF. Также в этой работе обнаружено, что антибиотик хлорамфеникол сильно воздействует на сродство к O_2 и константу Хилла HbF, и также обеспечивает изменения гибкости C-концов γ -субъединиц, в то время, как тетрамерная структура HbA остается почти не измененной. Переустройство

доменной структуры HbF сопровождается уменьшением стерического ограничения движения спин-метки.

Продолжаются исследования различных свойств гемоглобина А и фетального гемоглобина. Для гемоглобина А известна температура плавления +71°C, также известны температуры плавления HbА в растворах с различными криопротекторами (глицерин, 1,2-пропандиол) до и после замораживания-оттаивания [26].

Для гемоглобина кордовой (пуповинной) крови были исследованы температуры плавления в контроле и обнаружено, что гемоглобин кордовой крови гетерогенный по своему составу, поэтому и наблюдается два максимума на кривой теплопоглощения. Также были исследованы температуры плавления гемоглобина кордовой крови в растворах с различными концентрациями криопротекторов [27]. А для фетального гемоглобина, выделенного из кордовой крови, такие исследования проведены в работе [28].

Одним из методов изучения распределения по белковой макромолекуле полярных и неполярных групп является взаимодействие органических красителей с белками [29]. В отношении гемоглобина А картина ясна [30], и в случае фетального гемоглобина подобные данные описаны в работе [31]. Проведены исследования сорбции различными формами гемоглобина А бромтимолового синего (БТС). Определено, что оксигенированный гемоглобин А меньше связывает БТС, чем дезоксиформа HbА вследствие конформационных изменений в процессе насыщения гемоглобина кислородом, а именно, уменьшения неполярной поверхности гемоглобина, и так как взаимодействие БТС с белком осуществляется за счет гидрофобных сил, то оксиHbА сорбирует БТС меньше, чем дезоксиHbА [29]. Между анионным красителем и белком при рН большем и равном рI (для оксиHbА изоэлектрическая точка равна 6,87, дезоксиHbА - 6,68 [7], для фетального гемоглобина - 7,22, хотя при этом для гемоглобина А дано значение 7,13 [11]) преобладают гидрофобные взаимодействия [29], поэтому параметры сорбции этими белками бромтимолового синего могут дать сведения о распределении гидрофильных и гидрофобных групп на поверхности HbF в сравнении с HbА. Из аминокислотной последовательности β- и γ-цепей гемоглобинов А и F [6] видно, что HbF содержит больше полярных, а HbА, в свою очередь, больше неполярных аминокислотных остатков.

Таким образом, дальнейшие исследования свойств фетального гемоглобина и гемоглобина А остаются актуальными.

Список литературы: 1. Белоус А.М., Луговой В.И., Лемешко В.В. // Проблемы криобиохимии. – Вестн. АН УССР. – 1976. - №2. – С. 38-48. 2. Koseki T., Kitabatake N., Doi E. Freezing denaturation of ovalbumin at acid pH // J. Biochem. – 1990. – Vol. 107, № 3. – P. 389-394. 3. Anchordoquy T.J., Carpenter J.F. Polymers protect lactat dehydrogenase during freeze-drying by inhibiting dissociation in the frozen state // Arch. Biochem. Biophys. – 1996.- Vol. 332, №2. - P. 231-238. 4. Cao E., Foster P.R. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions // Biotechnol. Bioeng. – 2003. – Vol. 82, № 6. – P. 684-690. 5. Карлсон Б. Основы эмбриологии по Пэттену: В 2 т. Пер. с англ. – М.: Мир, 1983. – Т. 1. – 357 с. 6. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р. Основы биохимии: В 3 т. Пер. с англ. – М.: Мир., 1981. – Т. 3. - 726 с. 7. Страйер Л. Биохимия: В 3 т. Пер. с англ. - М.: Мир, 1984. – Т. 1. - 232с. 8. Hofmann O., Carrucan G., Robson N. The chloride effect in the human embryonic haemoglobins // Biochem. J. – 1995. – Vol. 309. – P. 959-962. 9. Торубарова Н. А.

Эмбриональный и фетальный гемопоэз: актуальные вопросы // Гематология и трансфузиология.- 1991. - Т. 36, №5. - С. 20-24. 10. Уиллоуби М. Детская гематология: Пер. с англ. – М.: Медицина, 1981. – 672 с. 11. Дударев В. П. Роль гемоглобина в механизмах адаптации к гипоксии и гипероксии. - К.: Наукова думка, 1979. – 152 с. 12. Клиническая биохимия. Руководство по клинической лабораторной диагностике: В 3 ч. – М.: Медицина, 1981. – Ч. 3. – 215 с. 13. Аршава В. П. Фетальный гемоглобин при сердечно-сосудистой патологии // Терапевтич. Архив. - 1973. - Т. 45, № 11.- С. 53-56. 14. Семенчева Э. М. Типы гемоглобина в норме и при воздействии на организм некоторых химических веществ: Автореф. дис.... д-ра мед. наук. – К., 1972. – 54 с. 15. Антоненко В. Т., Королев Ю. Н. Особенности кислородсвязывающей функции фетального гемоглобина // Гематология и трансфузиология. - 1983. - Т. 28, №5. - С. 61-64. 16. Лопатина Н. И., Данилова Л. А., Шабалов Н. П. И др. Актуальные вопросы неопатологии.- Л.: Наука, 1979. - С. 69-73. 17. Mann L. J., Romney S. L. // Ibid. – 1968. - Vol. 101. - P. 520-528. 18. Проссер Л., Браун Ф. Сравнительная физиология животных: Пер. с англ. - М.: Медицина, 1967. – 380 с. 19. Desforges J. F. // New Engl. L. Med. – 1976. - Vol. 236. - P. 625-634. 20. Антоненко В. Т. Фетальный гемоглобин и адаптация к гипоксии. Применение препаратов Ф-Нб в лечении гипоксических состояний // Молекулярные аспекты адаптации к гипоксии. - К.: Наукова думка. – 1979. – С. 31-36. 21. Аршава В. П. Фетальный гемоглобин при сердечно-сосудистых заболеваниях // Труды IX съезда терапевтов УССР. - К.: Наукова думка. – 1974. - С. 141-142. 22. Циркина А. С., Золотницкая Р. П. Фетальный гемоглобин при хронических заболеваниях печени. Лабораторная диагностика // Тезисы Всесоюз. съезда врачей, лаборантов: общехимич. методы. Клиническая гематология. Коагулология. - М.: Медицина. – 1979. - С. 144. 23. Циркина А. С. Изменение уровня фетального гемоглобина при спленэктомии у детей, больных некоторыми видами анемий // Матер. 27 научн. сессии Груз. научн.-исслед. ин-та гематол. и перелив. крови им. Г. М. Мухадзе. – Тбилиси: Сабчота Сакартвело. – 1975. - С. 403-405. 24. Militello V., Vitrano E, Cupane A. The effect of organic cosolvents on the oxygen affinity of fetal hemoglobin. Relevance of protein- solvent interactions on the functional properties // Biophys. Chem. - 1991. – Vol. 39, № 2. P. 161-169. 25. Gantchev T., Costadinova Z., Ganeva E. Comparative spin-label study of the dynamic structure of human hemoglobins A and F and the influence of the antibiotic, chloramphenicol // Biochim. Biophys. Acta. – 1988. – Vol. 953. – P. 218-225. 26. Соловьева А.С. Калориметрические исследования термоденатурации изолированных и мембраносвязанных белков в присутствии некоторых криопротекторов до и после охлаждения до -196°C : Дис.... канд. биол.наук. – Харьков, 1997. – 131 с. 27. Соловьева А.С., Зинченко А.В. Сравнительное микрокалориметрическое исследование плавления гемоглобина из донорской и кордовой крови до и после низкотемпературного воздействия // Проблемы криобиологии. - 2000. - № 1. - С. 32-35. 28. Онищенко Е.В., Тимченко Н.Н. Влияние низких температур, глицерина и 1,2-пропандиола на термоденатурацию фетального гемоглобина// Проблемы криобиологии.-2002.-№1.-С. 113-114. 29. Левин С.В. Структурные изменения клеточных мембран.- Л.: Наука, 1976. - 224 с. 30. Antonini E., Wyman J., Moretti R., Rossi-Fanelli A. The interaction of bromthymol blue with hemoglobin and its effect on the oxygen equilibrium // Biochim. et Biophys. Acta. - 1963. - Vol. 71. - P. 124-138. 31. Тимченко Н.Н., Розанова Е.Д., Кучеренко Ю.В., Леонов Б.Н. Аутоокисление гемоглобинов А и F после замораживания-оттаивания // Проблемы криобиологии.-2002.-№4.-С.68-71.

Поступила в редколлегию 10.01.08