

12. Parker F. S. Application of infrared spectroscopy in biochemistry, biology and medicine.— New York: Plenum press, 1971.— 483 p.
13. Беллами Л. Инфракрасные спектры сложных молекул.— М.: Изд-во иностр. лит., 1965.— 590 с.
14. Pearson I. E., Slifkin M. A. The infrared spectra of amino acids and dipeptides // Spectrochim. acta.— 1972.— 28, N 12.— P. 2403—2413.
15. Suzuki S., Shimanouchi T., Tsuboi M. Normal vibrations of glycine and deuterated glycine molecules // Ibid.— 1963.— 19.— P. 1195—1208.
16. The infrared absorption spectrum of obigen-1 labelled glycine / I. Lauticht, S. Pinchas, D. Samuel, I. Wasserman // J. Phys. Chem.— 1966.— 70, N 2.— P. 2719—2725.
17. Wang C. H., Storms R. D. Raman study of hydrogen bonding and long-wavelength lattice modes in an L-alanine single crystal // J. Chem. Phys.— 1971.— 55, N 10.— P. 5110—6119.
18. The temperature-dependence of the far infrared spectra of L-alanine / I. Bandekar, L. Genzel, F. Kremer, L. Santo // Spectrochim. acta.— 1983.— 39A, N 4.— P. 357—366.
19. Герцберг Г. Колебательные и вращательные спектры многоатомных молекул.— М.: Изд-во иностр. лит., 1949.— 647 с.
20. Амелькин С. В., Оравский А. Н. Многофотонное возбуждение колебаний молекул в электрическом поле // Труды физ. ин-та АН СССР.— 1988.— 187.— С. 178—201.
21. Таунс Ч., Шавлов А. Радноспектроскопия.— М.: Изд-во иностр. лит., 1959.— 756 с.

Врем. науч. коллектив «Отклик», Киев
Ин-т полупроводников АН УССР, Киев

Получено 05.07.90

УДК 544.344

А. А. Серейская, И. В. Смирнова

ДЕЙСТВИЕ НАТИВНОГО (α) И МОДИФИЦИРОВАННОГО (γ) ТРОМБИНОВ НА N-КОНЦЕВЫЕ ФРАГМЕНТЫ ФИБРИНОГЕНА БЫКА

Сравнивается гидролиз N-концевых фрагментов фибриногена быка нативным α -тромбином и его некоагулянтной γ -формой с нарушенным дополнительным центром узнавания высокомолекулярных субстратов. Обнаружено, что чувствительная к тромбину связь 19—20 фрагмента 1—54 A α -цепи фибриногена, изолированного или в составе N-концевого дисульфидного узла, гидролизуеться α -тромбином намного эффективнее, чем γ -формой фермента. Разница между ними исчезает при отщеплении последовательности 37—54 с C-конца фрагмента, причем скорость гидролиза α -тромбином снижается до уровня γ -формы. Эти результаты свидетельствуют о том, что: 1) в пределах последовательности 37—54 A α -цепи фибриногена быка находится участок «узнающий» дополнительный центр тромбина; 2) взаимодействие между ним и дополнительным центром приводит к усилению каталитического действия активного центра фермента.

Введение. Тромбин (ТР) инициирует свертывание фибриногена (ФГ), отщепляя с N-концов его A α -цепей фибринопептиды А (ФПА). Затем в процессе свертывания ТР гидролизует еще несколько связей в N-концевых участках A α - и B β -цепей фибриногена, но гораздо медленнее [1].

Характерной особенностью ТР является его способность сохранять каталитическую активность в отношении низкомолекулярных субстратов при резком снижении или полной потере ряда важных физиологических функций, в том числе и свертывающей. Такими свойствами обладают β , γ и другие формы ТР, полученные из коагулянтного (свертывающего) α -ТР путем определенных модификаций его структуры. Полагают, что у этих форм нарушен дополнительный центр (экзосайт) связывания — узнавания высокомолекулярных субстратов, отделенный от активного центра [2—4].

Разными авторами предпринимались попытки локализовать участок на ФГ, ответственный за связывание с дополнительным центром ТР. Для этого действие ТР на ФГ изучали по отщеплению ФПА при гидролизе пептидной связи во фрагментах ФГ различной длины. Результаты исследований привели к предположению о том, что участок специфического узнавания тромбина удален от расщепляемой связи и

© А. А. СЕРЕЙСКАЯ, И. В. СМИРНОВА, 1991

находится на А α -цепи ФГ человека в пределах последовательности 34—51 [1, 5, 6].

Задача настоящей работы — локализация узнающего участка на ФГ с помощью некоагулянтного γ -ТР, действие которого на фрагменты ФГ ранее не изучалось. Основой наших экспериментов стало предположение о том, что разрушение дополнительного центра при превращении α -ТР в γ -форму должно:

а) резко снизить эффективность гидролиза тромбином фрагментов ФГ, имеющих в своем составе гипотетический «узнающий» участок, и лишенных его;

б) привести к тому, что эти фрагменты будут гидролизоваться α - и γ -ТР с одинаковой эффективностью.

Эксперименты проводили на выделенных нами N-концевых фрагментах ФГ быка. Сравнивали гидролиз их α - и γ -тромбинами человека.

Материалы и методы. α -ТР выделяли из пасты фракций II+III по Кону крови человека, γ -ТР получали путем автолиза α -ТР в 3 М NaCl, pH 8,0, при температуре 22 °С в течение 3—5 сут [7].

Свертывающую активность тромбина определяли по времени образования фибринового сгустка, амидазную — по гидролизу Tos-Gly-Pgo-Arg-pNa (хромозим Th), измеряя оптическое поглощение освобождающегося p-нитроанилина при 405 нм [8].

Выделенный из плазмы крови быка с помощью фракционного высаливания сернокислым натрием ФГ [9] подвергали бромциановому расщеплению в кислой среде. Смесь фрагментов разделяли гель-фильтрацией для получения наиболее высокомолекулярного продукта расщепления — N-концевого дисульфидного узла (НДСУ) [10]. Последний после рехроматографии обрабатывали β -меркаптоэтанолом в 8 М мочеvine [11] для восстановления дисульфидных связей, соединяющих N-концевые фрагменты А α -, B β - и γ -цепей ФГ. Алкилированные йодуксусной кислотой фрагменты разделяли гель-фильтрацией и ионообменной хроматографией. Фрагменты идентифицировали с помощью аминокислотного анализа, гель-электрофореза, флуоресцентной спектроскопии, по наличию фибринопептидов.

Для определения фибринопептидов А и Б в НДСУ и А α 1—54 их (а также ФГ — в качестве контроля) гидролизовали ТР (отщепляет от ФГ фибринопептиды А и Б) и тромбинсподобным ферментом змеиного яда анцистроном Н (отщепляет только фибринопептид А [12]). Фибринопептиды идентифицировали методом высоковольтного электрофореза на бумаге.

Для модификации фрагмента А α -цепи 1—54 его расщепляли по остаткам триптофана, обработав N-бромсукцинимидом [13].

Более подробно разработанная нами методика получения N-концевых фрагментов ФГ опубликована ранее [14].

Фрагменты ФГ гидролизовали α - и γ -тромбинами в 0,05 М карбонатном буфере, pH 8,5, с 0,1 М NaCl. Количество освобожденных аминокрупп при гидролизе пептидной связи определяли по реакции с флуорескаминном [15]. Спектры флуоресценции и ее интенсивность регистрировали на спектрофлуориметре «Hitachi» (Япония), модель 850.

Результаты и обсуждение. Один из основных способов получения некоагулянтного ТР — автолитическое расщепление. Однако описанные разными авторами методики автолиза [7, 16] варьируют и нам пришлось опытным путем подбирать различные условия. В растворе с низкой ионной силой (0,02—0,05 М NaCl, pH 8,0) при малых концентрациях фермента (0,4 мг/мл) свертывающая активность ТР снижается очень медленно (до 16 % за 13 сут), параллельно уменьшается и амидазная (до 17 %). Очевидно, расщепление пептидных связей в области дополнительного центра ТР в этом случае сопряжено с денатурацией белка, что отражается на общей каталитической активности фермента. Кроме того, не исключено действие на ТР протеаз микробного происхождения, так как для экспериментов стерильные условия не создавались.

Повышение ионной силы среды препятствовало денатурации и, вероятно, способствовало автолитическому разрушению дополнительного центра; при этом происходила почти полная потеря способности ТР свертывать ФГ, в то время как активность в отношении хромозима Th существенно не изменялась и составляла 82—100 % от исходной. Увеличение концентрации соли, по-видимому, дестабилизирует те электростатические взаимодействия, которые участвуют в формировании

Таблица 1

Свойства α -ТР и продукта его автолиза γ -ТР, полученного в 3 М NaCl, pH 8,0 (концентрация фермента 2,4 мг/мл)

Properties of α -thrombin and its autolysis product (γ -thrombin), obtained in solution of 3 M NaCl, pH 8,0 at enzyme concentration 2,4 mg/ml

Форма ТР	Ферментативная активность				Молекулярная масса по электрофорезу в ПААГ с DS-Na
	По свертыванию фибриногена		По гидролизу хромозима Th		
	NIN ед./мг	%	катал/моль	%	
α	2500	100	87	100	36000
γ 4 °C, 5 сут	65	2,6	90	100	11000
γ 22 °C, 3 сут	35	1,4	70	82	13000

Примечание. γ -ТР состоит из трех фрагментов размерами: B1 — 13 000, B3-A — 11 000, B4 — 13 000 [17].

дополнительного центра, вследствие чего он становится более доступным для автолитического разрушения. Поэтому оптимальными условиями для получения γ -ТР, по нашему мнению, является 3 М NaCl, pH 8,0, в среде которого через 3—5 сут (в зависимости от температуры) по ферментативной активности и электрофорезу в ПААГ наблюдали 90—95 %-ное превращение α -ТР в γ -форму. Свойства обеих форм фермента приведены в табл. 1.

Амидазная активность полученных нами препаратов α - и γ -ТР практически одинакова и в 2 раза превосходит активность трипсина в отношении того же специфического для ТР низкомолекулярного субстрата. Это служит доказательством сохранности у γ -ТР интактного активного центра со всеми его особенностями, а дополнительный центр, судя по падению свертывающей активности, нарушен.

Препараты α - и γ -ТР использовались нами для изучения роли дополнительного центра фермента в гидролизе фрагментов фибриногена. Субстратами тромбина служили фрагмент A α -цепи 1—54, выделенный из НДСУ фибриногена быка, сам НДСУ и их производные, полученные расщеплением полипептидной цепи по остаткам триптофана. Фрагмент A α 1—54 ФГ быка соответствует A α 1—51 ФГ человека (рис. 1), эксперименты с которым привели к предположению о важной роли последовательности 34—51 в эффективном гидролизе связи 16—17 [1, 5, 6] (19—20 на ФГ быка). Кроме A α 1—54, НДСУ ФГ быка содержит фрагменты цепей B β 1—143 и γ 1—78 (рис. 2). НДСУ ФГ быка и человека отличаются по локализации остатков Trp и Tyr. У первого во фрагменте A α есть триптофан и нет тирозина, во фрагментах B β и γ , наоборот, имеется тирозин, а триптофан отсутствует. Это дало нам возможность 1) идентифицировать A α 1—54 по спектру, характерному для триптофановой флуоресценции с максимумом при ~350 нм (тирозиновое плечо с максимумом при ~310 нм отсутствует); 2) отождествить модификацию остатков триптофана N-бромсукцинимидом в изолированном фрагменте A α 1—54 и в составе НДСУ. Ход реакции проверяли по снижению триптофановой флуоресценции и величины A₂₈₀. Последняя соответствовала модификации двух остатков триптофана в A α 1—54 и четырех — в НДСУ (НДСУ является димером). Следовательно, обработка N-бромсукцинимидом указанных

фрагментов приводит к расщеплению полипептидной цепи Аα 1—54 по триптофану в положениях 36 и 44. Пептидная связь, гидролизуемая тромбином, сохраняется во фрагменте Аα 1—36 (см. рис. 1).

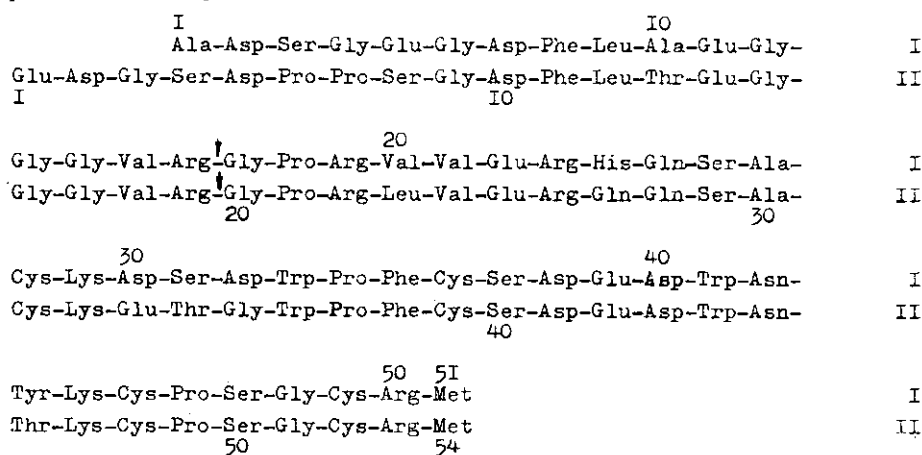


Рис. 1. Строение N-концевого бромцианового фрагмента Аα-цепи фибриногена человека (I) [5] и быка (II) [18]. Указана связь, предпочтительно расщепляемая тромбином

Гидролиз фрагментов ФГ тромбином определяли по реакции с флюорескаминном освобождающихся N-концевых аминогрупп. Учитывали прирост α-NH₂-группы в пробах, отобранных в ходе инкубации ТР с субстратом. Эксперименты показали, что α- и γ-ТР гидролизуют все использованные в качестве субстратов фрагменты. γ-ТР более слабый катализатор, чем

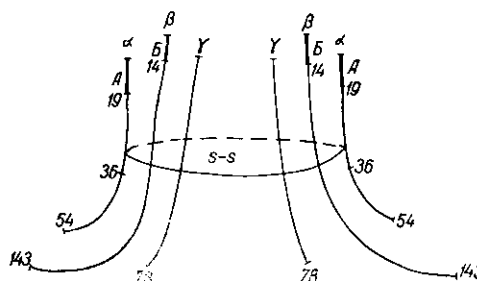


Рис. 2. Схема строения N-концевого дисульфидного узла фибриногена быка [19]. α, β, γ — цепи фибрина; А, Б — фибринопептиды

α-ТР. При работе с ним для достижения ощутимого эффекта приходилось увеличивать концентрацию фермента в пробе с $(0,4-1) \cdot 10^{-9}$ М до $2 \cdot 10^{-8}$ М.

Максимальное увеличение количества α-аминогрупп в наших опытах составляло 100 % от исходной величины, что соответствует расщеплению одной пептидной связи. Очевидно, гидролизу подвергалась связь Arg19—Gly20 Аα-цепи, как известно, наиболее чувствительная к ТР. По приросту количества свободных аминогрупп рассчитывали начальную скорость реакции, выражали ее в каталах (моль субстрата/с) и соотносили с концентрацией фермента. Эта величина по способу выражения ($V_0/[E]$) сходна с $k_{кат}$, но их нельзя отождествлять, так как ввиду недостаточного количества материала — фрагментов ФГ, пришлось ограничиться только одной концентрацией субстрата. Тем не менее, не настаивая на абсолютном значении этих величин, можно на их основании сравнить эффективность гидролиза α-тромбином и его некоагулянтной γ-формой различных фрагментов ФГ (табл. 2).

Анализ экспериментальных данных показывает, что α-ТР гораздо лучше гидролизует НДСУ и Аα 1—54, чем γ-форма. Так как основное различие между этими формами ТР заключается в нарушении дополнительного центра у γ-ТР, подтверждается необходимость взаимодействия ТР с ФГ не только за счет активного, но и дополнительного центра. При гидролизе обработанных N-бромсукцинимидом НДСУ и Аα 1—54 для обеих форм фермента получены одинаковые результаты.

Скорость ферментативного процесса для α -ТР, значительно уменьшенная по сравнению с гидролизом немодифицированных фрагментов, становится такой же, как для γ -ТР. На действие γ -ТР модификация субстратов не влияет. Следовательно, расщепление $A\alpha$ -цепи по Trp36 и Trp44 превратило НДСУ и $A\alpha$ 1—54 из специфических субстратов ТР

Таблица 2
Гидролиз α - и γ -тромбинами
N-концевых фрагментов фибриногена
быка
Bovine fibrinogen N-terminal fragments
hydrolysis by α - and γ -thrombins

Субстрат	α -ТР γ -ТР	
	катал/моль	
НДСУ	34,8	2,9
НДСУ, обработанный N-бромсукцинимидом	1,5	1,5
$A\alpha$ 1—54	15,7	2,0
$A\alpha$ 1—36	1,4	1,4

в неспецифические. Это сопровождается резким снижением эффективности гидролиза α -тромбином; очевидно, дополнительный центр в процессе не участвует. Потеря чувствительности к дополнительному

центру при отщеплении участка 37—54 означает, что в нем находится элемент структуры ФГ, ответственный за специфическое взаимодействие с коагулянтной формой ТР вне активного центра.

Данные, приведенные в табл. 2, дают основание для обсуждения еще одного вопроса — причины большей эффективности гидролиза НДСУ по сравнению со свободным фрагментом $A\alpha$ 1—54. Поскольку некоторое повышение скорости гидролиза характерно и для γ -ТР, можно допустить некие конформационные изменения в области расщепляемой связи 19—20 при выделении фрагмента $A\alpha$ 1—54 из НДСУ, ухудшающие ее связывание в активном центре.

Последовательность 37—54 ФГ быка, играющая, как показано, важную роль при взаимодействии ТР с ФГ, содержит кластер отрицательно заряженных аминокислотных остатков. Анионный характер ее согласуется с предполагаемой катионной природой дополнительного центра ТР [2, 3, 20]. Участие ионных связей в специфическом взаимодействии ТР с ФГ показано нами ранее [21]. С учетом этого основные результаты настоящего исследования изображены в виде следующей схемы.

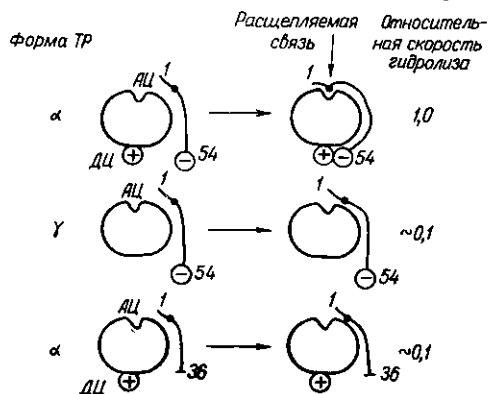


Таблица 3
Типы высокомолекулярных субстратов
тромбина и эффективность их гидролиза
Types of thrombin high molecular substrates and
their hydrolysis efficiency

Субстрат	Отношение скорости гидролиза γ -ТР к α -ТР	Тип субстрата	Активность α -тромбина, катал/моль
ФГ человека (по отщеплению ФПА) [24]	0,02	I	84,0
ФГ быка НДСУ	0,08	I	34,8
НДСУ, обработанный N-бромсукцинимидом	1,00	II	1,5
$A\alpha$ 1—54	0,12	I	15,7
$A\alpha$ 1—36	1,00	II	1,4
Б-цепь инсулина	1,00	II	$6,4 \cdot 10^{-5}$
Химотрипсиноген	1,00—1,50	II	—

Выводы, которые можно сделать на основании всего изложенного в данной работе, а также в предшествующей статье, посвященной сравнению действия α - и γ -форм ТР на неспецифические белковые субстраты химотрипсиноген и В-цепь инсулина [22], согласуются с нашей гипотезой о двух типах высокомолекулярных субстратов ТР, различающихся по наличию в их структуре участка, комплементарного дополнительному центру [4, 23]. Фрагмент А α 1—54, НДСУ, как и сам ФГ, следует отнести к субстратам I типа. У фрагмента А α 1—36 скорость гидролиза связи Arg19—Gly20 уже не зависит от дополнительного центра фермента, поэтому А α 1—36 относится ко II типу субстратов ТР. К этому же типу принадлежат химотрипсиноген и В-цепь инсулина, так как они одинаково гидролизуются α - и γ -ТР. Очевидно, в их структуре отсутствует участок, функционально подобный находящемуся в пределах 37—54 А α -цепи ФГ, который был бы комплементарен дополнительному центру. Связывание субстратов II типа с ТР менее продуктивно и зависит, в основном, от степени соответствия вторичной контактной зоне активного центра фермента, имеющей гидрофобную природу. Весьма примечательно, что по требованиям вторичной специфичности тромбина ФГ нельзя отнести к лучшим его субстратам [2—4]. Тем не менее он так же, как и полученные из него НДСУ и А α 1—54, очень хорошо гидролизуются тромбином. В результате потери участка 37—54 А α -цепи, контактирующего с дополнительным центром, образуется субстрат А α 1—36, который гидролизует на порядок хуже. Следовательно, существует связь между участием дополнительного центра в протеолизе высокомолекулярных субстратов и эффективностью процесса (табл. 3). Возможно, с помощью дополнительного центра компенсируются дефекты конформации вблизи расщепляемой связи.

Недавно опубликованные результаты рентгеноструктурного анализа ТР человека [25] подтверждают реальность существования дополнительного центра. Показано, что узкая щель активного центра ТР, ограниченная гидрофобными остатками, снаружи еще окаймлена кластером положительно заряженных остатков, вероятно, и составляющих дополнительный центр. На самой поверхности молекулы в этой области находится связь Arg77A—Asn78, которая расщеплена у некоагулянтных β - и γ -форм ТР.

Можно представить, что при сближении за счет электростатических взаимодействий дополнительного центра с узнающим его анионным участком субстрата I типа создается конформация, оптимальная в смысле ориентации расщепляемой связи в каталитическом центре. Нарушение дополнительного центра, недостаточно эффективное взаимодействие с узнающим его участком высокомолекулярного субстрата приводят к искажению этой конформации, вследствие чего каталитический процесс значительно затруднен или практически не происходит.

В заключение важно отметить основные выводы данной работы.

1. Показано, что γ -ТР (фермент с нарушенным дополнительным центром) гидролизует НДСУ и А α 1—54 значительно менее эффективно, чем нативный α -ТР, содержащий интактный дополнительный центр.

2. При отщеплении С-концевого участка 37—54 фрагмента А α 1—54 (изолированного или в составе НДСУ) скорость гидролиза α -тромбина снижается до уровня, характерного для γ -формы, что указывает на необходимость данного участка для узнавания и эффективного расщепления чувствительной связи 19—20.

Авторы весьма признательны А. А. Гершковичу за плодотворную дискуссию при обсуждении результатов работы и А. И. Корнелюку — за любезно предоставленную возможность спектрофлуориметрических исследований.

Резюме

Порівнюється гідроліз N-кінцевих фрагментів фібриногену бика нативним α -тромбіном та його некоагулянтною γ -формою з пошкодженим додатковим центром впізнавання високомолекулярних субстратів. Знайдено, що чутливий до тромбіну зв'язок 19--20 фрагменту 1—54 $A\alpha$ -ланцюга фібриногену, ізольованого або в складі N-кінцевого дисульфідного вузла, гідролізується α -тромбіном набагато ефективніше, ніж γ -формою фермента. Різниця між ними зникає у разі відщеплення послідовності 37—54 з C-кінця фрагменту, причому швидкість гідролізу знижується до рівня γ -форми. Ці результати свідчать про те, що 1) в межах послідовності 37—54 $A\alpha$ -ланцюга фібриногену знаходиться ділянка, що «впізнає» додатковий центр тромбіну; 2) взаємодія між ним та додатковим центром призводить до посилення каталітичної дії активного центру фермента.

Summary

Bovine fibrinogen N-terminal fragments were hydrolysed by native α -thrombin and its nonclotting γ -form (with disrupted additional centre for high molecular substrates recognition). It was found that susceptible bond 19—20 of $A\alpha$ chain is cleaved by α -thrombin more efficiently than γ -form both in the structure of N-terminal disulfide knot and in the isolated $A\alpha$ fragment 1—54. This difference disappears as a result of peptide bonds splitting due to $A\alpha$ Trp36 and Trp44 modification. The rate of α -thrombin hydrolysis of modified substrates is lowered significantly and reached the γ -thrombin level.

The data presented here establish that 1) the specific site complementary to thrombin additional recognition centre is localized within the sequence 37—54 of bovine fibrinogen $A\alpha$ chain; 2) interactions between fibrinogen and thrombin recognition sites are necessary for effective 19—20 bond hydrolysis.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Blomback B.* Specificity of thrombin and its action on fibrinogen // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*— 1986.— **485**.— P. 120—123.
2. *Fenton J. W.* II. Thrombin specificity // *Ibid.*— 1981.— **370**.— P. 468—495.
3. *Fenton J. W.* II. Regulation of thrombin generation and function // *Semin. Thromb. Hemost.*— 1988.— **14**, N 3.— P. 234—240.
4. *Структова С. М., Серейская А. А., Осадчук Т. В.* Структурные основы специфичности тромбина // *Успехи соврем. биологии.*— 1989.— **107**, № 1.— С. 41—54.
5. *Hogg D. H., Blomback B.* Mechanism of fibrinogen-thrombin interaction // *Thromb. Res.*— 1978.— **12**, N 6.— P. 953—964.
6. *Van Nispen J. W., Hageman T. C., Scheraga H. A.* Mechanism of action of thrombin on fibrinogen // *Arch. Biochem. and Biophys.*— 1977.— **182**, N 1.— P. 227—243.
7. *Human thrombin: Preparative evaluation, structural properties, and enzymic specificity* / J. W. Fenton, B. H. Landis, D. A. Walz et al. // *Chem. and physiol. of human plasma proteins* / Ed. D. H. Bing.— New York: Pergamon press, 1979.— P. 151—173.
8. *Гершкович А. А., Кибирев В. К.* Хромогенные и флуорогенные пептидные субстраты протеолитических ферментов // *Биоорг. химия.*— 1988.— **14**, № 11.— С. 1461—1488.
9. *Варецкая Т. В.* Микрогетерогенность фибриногена: Криофибриноген // *Укр. биохим. журн.*— 1960.— **32**, № 1.— С. 13—24.
10. *Primary structure of human fibrinogen and fibrin. 1. Cleavage of fibrinogen with cyanogen bromide* / B. Blomback, B. Hessel, S. Iwanaga et al. // *J. Biol. Chem.*— 1972.— **277**, N 5.— P. 1496—1512.
11. *Henschen A., Edman P.* Large scale preparation of S-carboxymethylated chains of human fibrin and fibrinogen and the occurrence of γ -chain variants // *Biochim. et biophys. acta.*— 1972.— **263**, N 2.— P. 351—367.
12. *Угарова Т. П.* Гемокоагулирующие ферменты из ядов змей // *Биохимия животных и человека.*— Киев: Наук. думка, 1989.— Вып. 13.— С. 65—74.
13. *Химическая модификация триптофановых остатков лейцил-тРНК-синтетазы N-бромсукцинимидом и 2-окси-5-нитробензилбромидом* / А. И. Корнелюк, В. В. Шилин, О. И. Гудзера и др. // *Биоорг. химия.*— 1985.— **11**, № 5.— С. 605—612.
14. *Пехник И. В., Хейломский А. Б., Чукурова Е. В.* Выделение и идентификация N-концевых бромциановых пептидов фибриногена быка // *Укр. биохим. журн.*— 1991.— **63**, № 2.— С. 123—126.
15. *Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins and primary amines in the picomole range* / S. Udenfriend, S. Stein, P. Böhrer et al. // *Science.*— 1972.— **178**, N 4063.— P. 871—872.

16. *Covalent structures of β and γ autolytic derivatives of human α -thrombin* / J.-P. Boissel, B. L. Bonnicc, M. J. Rabet et al. // *J. Biol. Chem.*—1984.—259, N 9.— P. 5691—5697.
17. *Proteolytic derivatives of thrombin* / J. Elion, J.-P. Boissel, B. Bonnicc et al. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*—1986.—485.— P. 16—26.
18. *Amino acid sequences of portions of the α and β chains of bovine fibrinogen* / R. A. Martinelli, A. S. Inglis, M. K. Rubira et al. // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1979.—192, N 1.— P. 27—32.
19. *Disulfide-linked cyanogen bromide peptides of bovine fibrinogen* / R. Timpl, P. P. Fietzek, E. Wachter, V. van Delden // *Biochim. et biophys. acta.*—1977.—490, N 2.— P. 420—429.
20. *Vali Z., Scheraga H. A. Localization of the binding site on fibrin for the secondary binding site of thrombin* // *Biochemistry.*—1988.—27, N 6.— P. 1956—1963.
21. *Пехник И. В., Селищева М. Ю., Серейская А. А. Влияние ионной силы на ферментативную активность тромбина* // *Биополимеры и клетка.*—1990.—6, № 3.— С. 59—65.
22. *Серейская А. А., Пехник И. В., Осадчук Т. В. Действие различных форм тромбина на неспецифические высокомолекулярные субстраты* // *Биохимия.*—1990.—55, № 4.— С. 645—652.
23. *Серейская А. А., Струкова С. М. Особенности действия тромбина на высокомолекулярные субстраты* // *Докл. АН СССР.*—1985.—282, № 2.— С. 481—484.
24. *Catalytic competence of human α - and γ -thrombin in the activation of fibrinogen and factor XIII* / S. D. Lewis, L. Lorand, J. W. Fenton II, J. A. Shafer // *Biochemistry.*—1987.—26, N 24.— P. 7597—7603.
25. *The refined 1.9 Å crystal structure of human α -thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment* / W. Bode, I. Mayr, U. Baumann et al. // *EMBO J.*—1989.—8, N 11.— P. 3467—3475.

Ин-т биоорг. химии и нефтехимии АН УССР, Киев

Получено 18.10.90

УДК 615.357.631:577.15+611.657

Ю. И. Губский, Е. Л. Левицкий, Р. Г. Примак, А. Н. Величко

ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРНОГО СОСТОЯНИЯ ФРАКЦИОНИРОВАННОГО ХРОМАТИНА ПЕЧЕНИ ПРИ АКТИВАЦИИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

Обнаружено изменение структурного состояния фракций транскрипционно активного и репрессированного хроматина печени крыс при стимуляции перекисного окисления липидов тетрахлорметаном и Е-витаминной недостаточностью, заключающееся в релаксации структуры второй фракции и компактизации первой. Указанные нарушения могут быть связаны с изменением содержания металлов (Са, Fe, Си) в исследованных фракциях хроматина.

Введение. Одним из основных молекулярных механизмов действия ряда генотоксических факторов (облучение, химические повреждения, старение и др.) на клетку является свободнорадикальное повреждение ДНК и хроматина [1—3]. При этом основными генераторами свободных радикалов могут быть полиненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов биологических структур — мембран и хроматина [4, 5]. Ранее нами были обнаружены резкие нарушения функционирования фракций изолированного хроматина при активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) *in vivo* и *in vitro* [6—8].

В настоящей работе проведен анализ структурного состояния фракций транскрипционно активного (ТАХ) и репрессированного хроматина (РХ) печени крыс при активации ПОЛ однократным введением классического прооксидантного агента тетрахлорметана (ТХМ) [3] и содержании животных на Е-авитаминозном рационе [9]. В качестве критериев, характеризующих структурное состояние хроматина, использовали спектры его собственной флюоресценции, отношение белок/ДНК и процентное содержание фракций. Состояние липидного

© Ю. И. ГУБСКИЙ, Е. Л. ЛЕВИЦКИЙ, Р. Г. ПРИМАК, А. Н. ВЕЛИЧКО, 1991