

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 флуоресценции, отношение белок/ДНК и процентное содержание фракций. Состояние липидного

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

компонента в хроматине оценивали по спектрам флюоресценции комплекса хроматин — пирен, а белковой части хроматина — по тепловыделению при взаимодействии фракций хроматина с фосфатидилхолиновыми липосомами. Учитывая важную роль ионов металлов в формировании структуры хроматина [10—13], определяли также содержание ряда биометаллов (Fe, Cu, Ca) в исследуемых фракциях хроматина.

Материалы и методы. В работе использовали крыс-самок линии Вистар трехмесячного возраста (150—200 г). Животных декапитировали под легким эфирным наркозом в утренние часы, печень извлека-

Таблица 1

Характеристики хроматина печени крыс в условиях стимуляции ПОЛ

E-авитаминозом ($n=6$)

Characteristics of rat liver chromatin under LPO stimulation by *E*-avitaminosis ($n=6$)

Показатели	РХ		ТАХ	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Фракция, %	90,7	93,0*	9,3	7,0*
Белок/ДНК	1,3	1,3	11,0	10,4
Диеновые конъюгаты, нмоль/мг белка	48,2	30,3	43,9	107,9*

* $P < 0,05$ (по сравнению с контролем).

ли и из нее выделяли фракции ТАХ и РХ [8]. Состояние *E*-авитаминоза моделировали содержанием животных в течение 2 месяцев на диете, лишенной α -токоферола. Контрольных животных содержали на полноценной диете [9]. Тетрахлорметан вводили внутривентриально в дозе 2 мл/кг массы тела. Длительность интоксикации составляла 2 ч. В качестве контроля использовали интактных животных.

Определение продуктов ПОЛ (диеновых конъюгатов) во фракциях хроматина проводили, как описано ранее [3]. Концентрацию ДНК и белка во фракциях хроматина определяли спектрофотометрически [8]. Собственную флюоресценцию препаратов хроматина изучали в диапазоне 300—450 нм при длине волны возбуждения 280 нм. Состояние липидного компонента в хроматине оценивали с помощью флюоресцентного зонда пирена (10^{-5} М) по полосе эксимеров (470 нм) при длине волны возбуждения 340 нм. Флюоресцентные измерения проводили на спектрофлюориметре «Hitachi MPF-4» (Япония) при температуре 25 °С. Микрокалориметрическое изучение взаимодействия фракций изолированного хроматина с фосфатидилхолиновыми липосомами осуществляли на микрокалориметре LKB-2107 (Швеция), смешивая 2 мл хроматина (0,5 мг/мл) и 4 мл суспензии липосом (1 мг/мл) при температуре 26,0 °С. Липосомы из яичного лецитина (СССР) получали ультразвуковой обработкой на диспергаторе УЗДН-2Т (22 кГц, 10 мин).

Наличие металлов во фракциях хроматина определяли на атомно-адсорбционном спектрофотометре ААС-1 («Carl Zeiss», ГДР); кальций при длине волны 422,67, железо — 248,30, медь 327,50 нм [14].

Статистическую обработку полученных данных проводили непараметрическим методом [15], в связи с чем в таблицах ошибки средних величин не приведены.

Результаты и обсуждение. ТХМ [3, 8] и *E*-авитаминоз (табл. 1) вызывают резкую структурную перестройку в хроматине печени, характеризующуюся снижением фракции ТАХ и накоплением продуктов ПОЛ в этой фракции.

Исследование структурных характеристик фракционированного хроматина в условиях активации ПОЛ позволило установить следующие закономерности (рис. 1). В спектре собственной флюоресценции фракции РХ присутствуют три полосы: 310, 340 и 356 нм. Согласно

[16], эти полосы можно идентифицировать как тирозиновую составляющую, а также триптофаны II и III класса соответственно. В спектре ТАХ тонкой структуры не регистрируется: полоса имеет один максимум при 330 нм. Такое различие можно объяснить тем, что в белках этой фракции хроматина в отличие от РХ триптофановые остатки находятся преимущественно в I форме, т. е. внутри глобул, для которых характерен максимум при 330 нм, а тирозиновые вследствие перехода внутрь белковых макромолекул излучают с очень низким кван-

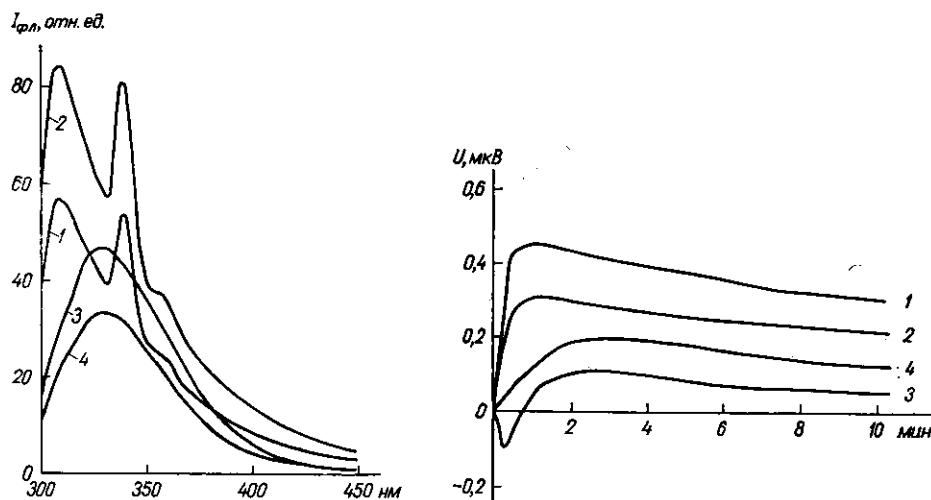


Рис. 1. Спектры собственной флюоресценции фракций хроматина при стимуляции ПОЛ ($C_{белка} = 1,0$ мг/мл): 1, 2 — РХ (контроль, опыт); 3, 4 — ТАХ (контроль, опыт) (1, 2 усилены в 30 раз по сравнению с 3, 4)

Рис. 2. Кинетика тепловыделения при взаимодействии фракций хроматина с фосфатидилхолиновыми липосомами при стимуляции ПОЛ: 1, 2 — РХ (контроль, опыт); 3, 4 — ТАХ (контроль, опыт)

товым выходом по сравнению с аналогичными группами, расположенными на поверхности макромолекул белка. Уширение полосы может быть объяснено присутствием как тирозидов, так и триптофанилов II класса.

Обнаруженные различия в спектрах собственной флюоресценции фракций ТАХ и РХ могут быть обусловлены различной степенью компактизации структуры этих фракций [3, 8]. Внутриглобулярное расположение компонентов белковых цепей во фракции ТАХ может способствовать большей «открытости» нитей ДНК, что приводит к повышению ее матричной активности [3].

При стимуляции ПОЛ ТХМ во фракции РХ наблюдается более высокая по сравнению с контролем интенсивность собственной белковой флюоресценции без изменения структуры спектра (рис. 1, кривые 1, 2). По-видимому, это может происходить вследствие удаления ДНК хроматина от белковой поверхности, так как в ней существуют группы (аминная, иминная, карбонильная и др.), способные тушить флюоресценцию тирозина и триптофана. Не исключено, что определенный вклад в наблюдаемое возгорание флюоресценции при стимуляции ПОЛ может вносить удаление молекул белков друг от друга, в результате чего наблюдается уменьшение контактов новых люминофорных центров с тушащими группами соседних белков. Эти процессы приводят в конечном итоге к релаксации структуры РХ в условиях активации ПОЛ. Аналогичная картина наблюдалась нами и при Е-авитаминозе.

Во фракции ТАХ активация ПОЛ вызывает снижение интенсивности собственной белковой флюоресценции также без изменения структуры спектра (рис. 1, кривые 3, 4). При Е-авитаминозе наблюдается сходная направленность процесса. Эти данные могут свидетельство-

вать об обратном по сравнению с РХ эффекте — конденсации (компактизации), приводящей к сближению ДНК с белковой поверхностью и более эффективному тушению флюорофоров.

Для анализа белкового компонента хроматина при активации ПОЛ использовали тепловые эффекты взаимодействия фракций хроматина с фосфатидилхолиновыми липосомами. Эти эффекты (рис. 2), по всей вероятности, являются результирующими двух разнонаправленных процессов: эндо — за счет разрушения структурированной воды и экзо — за счет образования связей между белками и липосома-

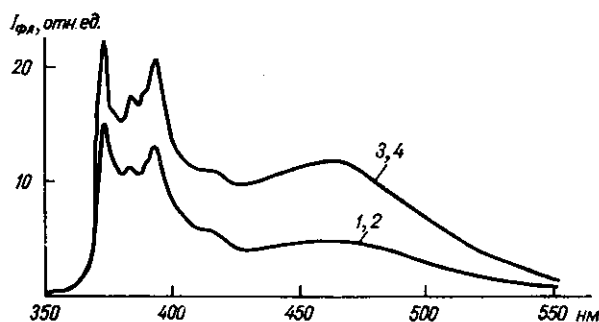


Рис. 3. Спектры флуоресценции пирена в образцах хроматина при стимуляции ПОЛ: 1, 2 — РХ (контроль, опыт); 3, 4 — ТАХ (контроль, опыт)

ми. Однако в случае ТАХ эндоэффект отчетливо проявляется, в то время как в РХ он скрыт из-за более сильного экзоэффекта. Видно, что активация ПОЛ приводит к уменьшению экзоэффекта взаимодействия РХ с липосомами. При этом кинетика процесса сохраняется, что свидетельствует о сохранении механизма комплексообразования и, вероятно, уменьшении мест связывания. Последнее обстоятельство может быть обусловлено тем, что на единицу поверхности липосомы при более рыхлой упаковке репрессированного хроматина приходится меньшее количество активных центров связывания, способных к взаимодействию.

В случае ТАХ воздействие ТХМ и Е-авитаминоза носит другой характер: экзоэффект возрастает, полностью нивелируя эндоэффект. Это свидетельствует, по всей вероятности, об увеличении мест связывания, поскольку можно предположить, что компактизация активной формы хроматина приводит к возрастанию (раскрытию) центров, способных к взаимодействию. Понятно, что на кинетику тепловыделения обеих форм хроматина оказывает влияние различное соотношение белок/ДНК (см. табл. 1). Таким образом, данные микрокалориметрии подтверждают наличие выявленных с помощью флуоресцентного анализа различий в компактизации структуры активной и репрессированной форм хроматина, возникающих при воздействии на организм экспериментальных животных стимуляции ПОЛ.

Использование флуоресцентного зонда пирена при анализе липидного компонента во фракциях хроматина основывалось на известных фактах о зависимости эксимеризации от микровязкости липидного окружения в мембранах [17] и отсутствии эксимеризации пирена в белках [18]. Наличие эксимеризации в рассматриваемых фракциях хроматина (рис. 3) указывает на то, что имеющиеся в хроматине липиды образуют надмолекулярные структуры мицеллярного типа с наличием гидрофобных зон. При равных концентрациях хроматина по отношению к белку и близких значениях в данных препаратах по фосфолипидам наблюдаемая нами интенсивность полосы эксимеров в случае ТАХ была заметно выше. Этот факт позволяет предположить, что, несмотря на сходство упаковки липидных образований в обеих фракциях хроматина, микровязкость мест локализации пирена в ТАХ несколько ниже, чем в РХ. Это, в свою очередь, может быть связано с различной плотностью упаковки и уровнем транскрипционной активности исследуемых фракций хроматина [3, 8].

Однако изменения значений эксимеризации в образцах ТАХ и РХ при стимуляции ПОЛ *in vivo* обнаружить не удалось. Этот факт также является косвенным подтверждением того, что обнаруженные различия в величине тепловыделения во фракциях хроматина при стимуляции ПОЛ обусловлены изменением в белковой составляющей хроматина.

Таким образом, в результате проведенных исследований удалось установить некоторые различия в характере структурной организации и плотности упаковки эндогенных липидов во фракциях ТАХ и РХ пе-

Таблица 2

Содержание ионов металлов во фракциях хроматина печени крыс в условиях стимуляции ПОЛ (мкг/мг белка) (n=6)

Contents of metal ions in rat liver chromatin fractions under LPO stimulation (mkg/mg protein)

Фракция хроматина	Ca	Fe	Cu	Фракция хроматина	Ca	Fe	Cu
	Е-авитаминоз				Тетрахлорметан		
РХ				РХ			
контроль	38,0	0,8	2,5	контроль	66,4	1,8	2,5
опыт	53,2*	1,2	5,9*	опыт	72,0	2,2	10,0*
ТАХ				ТАХ			
контроль	60,8	2,0	3,8	контроль	62,8	3,0	5,9
опыт	93,2*	2,3	1,5*	опыт	72,0*	3,3	2,5*

* $P < 0,05$ (по сравнению с контролем).

чени крыс. Более рыхлой (релаксированной) структуре ТАХ [3, 8] соответствует и менее плотная упаковка эндогенных липидов в этой фракции хроматина. Активация ПОЛ в условиях *in vivo*, наоборот, приводит к некоторой структурной компактизации ТАХ и релаксации РХ. Возможно, что обнаруженные различия в структурной организации исследованных фракций хроматина печени интактных животных и при стимуляции ПОЛ связаны с различным уровнем репликации и транскрипции ДНК в этих фракциях в условиях *in vivo*.

Выявленные отличия могут быть обусловлены и изменением количества металлов (Ca, Fe, Cu) при стимуляции ПОЛ в исследованных фракциях хроматина (табл. 2). Известно, что указанные металлы оказывают влияние на структурную организацию хроматина и на процессы ПОЛ [4, 10—13]. Обращает на себя внимание факт большего содержания железа и меди в ТАХ по сравнению с РХ. Различное содержание этих металлов может быть связано с большей интенсивностью процессов ПОЛ в ТАХ [6].

Индукция ПОЛ приводит к изменению количества всех исследованных металлов во фракциях хроматина, что особенно четко выражено в случае меди. Учитывая важную роль этих металлов в процессах компактизации — декомпактизации хроматина и ПОЛ [4, 10—13], можно предположить изменение их количества в условиях стимуляции ПОЛ как одну из возможных причин модификации структуры и процессов ПОЛ в хроматине.

Резюме

Виявлено зміни структурного стану транскрипційно активного та репресованого хроматину печінки при стимуляції перекисного окислення ліпідів, що проявляються в релаксації структури другого і компактизації першого. Вказані порушення можуть бути пов'язані із змінами вмісту металів (Ca, Fe, Cu) у вивчених фракціях хроматину.

Summary

Changes in the structural condition of transcriptionally active and repressed rat liver chromatin fractions under LPO stimulation by tetrachloromethane and E-vitamin insufficiency were revealed, which consist in the relaxation of the second fraction structure and the compactization of the first one. These disturbances may be connected with the change in the metal content (Ca, Fe, Cu) in the chromatin fractions studied.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Faney R. C.* Protection of DNA by thiols // *Pharmacol. Ther.*—1988.— **39**, N 1—3.— P. 101—108.
2. *Grdina D. J., Sigdestad C. P.* Radiation protectors: the unexpected benefits // *Drug Metab. Rev.*—1989.— **20**, N 1.— P. 13—42.
3. Перекисное окисление липидов и параметры термоденатурации фракций хроматина печени крыс / Ю. И. Губский, Е. Л. Левницкий, В. И. Чабанный и др. // *Укр. биохим. журн.*—1990.— **62**, № 2.— С. 76—82.
4. *Губский Ю. И.* Регуляция перекисного окисления липидов в биологических мембранах // *Биохимия животных и человека.*— Киев: Наук. думка, 1978.— Вып. 2.— С. 72—84.
5. *Vaca C. E., Harms-Ringdahl U.* Interaction of lipid peroxidation products with nuclear macromolecules // *Biochim. et biophys. acta.*—1989.— **1001**, N 1.— P. 35—43.
6. Перекисное окисление липидов фракций хроматина печени крыс / Ю. И. Губский, Е. Л. Левницкий, Н. Б. Гольдштейн, А. Я. Литошенко // *Докл. АН УССР. Сер. Б.*—1989.— № 2.— С. 70—72.
7. Перекисное окисление липидов и эндогенная ДНК-полимеразная активность фракций изолированного хроматина печени крыс / Ю. И. Губский, Е. Л. Левницкий, Н. Б. Гольдштейн, А. Я. Литошенко // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.*—1989.— **57**, № 3.— С. 296—298.
8. Функциональная активность фракционированного хроматина печени крыс при однократном введении тетрахлометана / Ю. И. Губский, Е. Л. Левницкий, Н. Б. Гольдштейн и др. // *Вопр. мед. химии.*—1989.— **35**, № 4.— С. 119—124.
9. Перекисное окисление липидов и транспорт Ca^{2+} в микросомах печени крыс при антиоксидантной недостаточности / Ю. И. Губский, М. Д. Курский, О. В. Задорина и др. // *Докл. АН УССР. Сер. Б.*—1987.— № 1.— С. 65—68.
10. *Lebkowsky J. S., Laemmli U. K.* Evidence for two levels of DNA folding in histone-depleted *HeLa* interphase nuclei // *J. Mol. Biol.*—1982.— **156**, N 2.— P. 309—324.
11. *Lebkowsky J. S., Laemmli U. K.* Non-histone proteins and long-range organisation of *HeLa* interphase DNA // *Ibid.*— P. 325—344.
12. *Иванов В. И.* О роли металлов в дезоксирибонуклеиновой кислоте // *Биофизика.*—1965.— **10**, № 1.— С. 11—16.
13. *Иванов В. И., Минченкова Л. Е.* Влияние ионов металлов переменной валентности на тепловую денатурацию ДНК // *Биохимия.*—1965.— **30**, № 6.— С. 1213—1217.
14. *Прайс В.* Аналитическая атомно-адсорбционная спектроскопия.— М.: Мир, 1976.— 355 с.
15. *Ашмарин И. П., Васильев И. И., Амбросов В. А.* Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов.— Л.: Изд-во Ленингр. гос. ун-та, 1979.— 79 с.
16. *Бурштейн Э. А.* Собственная флуоресценция белка.— М.: ВИНТИ, 1977.— 190 с.— (Сер. Биофизика; № 7).
17. *A method for measuring membrane viscosity using pyrene eximer formation / M. Dembo, V. Glushko, M. F. Aberlin, M. Sonenberg // Biochim. et biophys. acta.*—1979.— **522**, N 1.— P. 201—211.
18. *Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран.— М.: Наука, 1980.— 320 с.

НИИ фармакологии и токсикологии МЗ УССР, Киев

Получено 25.09.90