

LDH bound with zinc, cobalt, and nickel ions. It is noteworthy that one zinc ion binding is specific for LDH M<sub>4</sub>. It is shown that zinc ion binding causes the changes in the LDH kinetic properties, no changes in LDH secondary structure occurring.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vallee B. L., Galdes A. The metallobiochemistry of zinc enzymes // Adv. Enzymol. and Relat. Areas. Mol. Biol.— 1984.— 56.— P. 283—430.
2. Klevecz R. R., Kapp L. M. Intermittent DNA synthesis and periodic expression of enzyme activity in the cell cycle of WT-38 // Ibid. 1973.— 58, N 3.— P. 564—573.
3. Boiteux L., Goldbeter A., Hess B. Control of oscillating glycolysis of yeast by stochastic, periodic and steady source of substrate. A model and experimental study // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1975.— N 12.— P. 3829—3833.
4. Hess B., Goldbeter A., Lefever R. Temporal, spatial and functional order in regulated biochemical and cellular systems // Adv. Chem. Phys.— 1978.— 38, N 2.— P. 363—413.
5. Jecsai G. Crystalline lactic dehydrogenase from pig skeletal muscle // Acta phys. Acad. sci. hung.— 1961.— 20.— P. 339—341.
6. Брещадзе В. Г. УВЧ-индуцированная плазменная эмиссионная спектроскопия // Новые физ. методы в биол. исследованиях.— М.: Наука, 1987.— С. 33—45.
7. Сабурова Е. А., Маркович Д. С., Гольдштейн Б. И. Исследование pH-зависимости структурных и функциональных свойств лактатдегидрогеназы (M<sub>4</sub>). О косвенной кооперативности в лактатдегидрогеназе // Молекуляр. биология.— 1977.— 11, № 2.— С. 332—344.
8. Бакардзе И. Г., Монаселидзе Д. Р. Прецизионный дифференциальный микрокалориметр // Измерительная техника.— 1971.— № 2.— С. 58—60.
9. Nadal-Ginard B. Regulation of lactate dehydrogenase levels in the mouse // J. Biol. Chem.— 1978.— 253, N 1.— P. 170—177.

Ин-т физики АН ГССР, Тбилиси

Получено 16.06.89

УДК 544.344

© И. В. Пехник, М. Ю. Селищева, А. А. Серейская, 1990

#### ВЛИЯНИЕ ИОННОЙ СИЛЫ НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ТРОМБИНА

*Исследовано влияние ионной силы среды на активность тромбина (ТР) при действии его на фибриноген (ФГ) и низкомолекулярный субстрат. Сделан вывод о том, что условия низкой ионной силы ( $I=0,05-0,07$ ) благоприятны для специфического взаимодействия ТР с ФГ, не затрагивающего активного центра фермента.*

**Введение.** По современным представлениям, в протеолизе фибриногена тромбином, кроме активного, участвует и дополнительный центр (ДЦ) — особый элемент молекулы фермента, ответственный за узнавание и связывание высокомолекулярных субстратов [1]. До настоящего времени ДЦ остается структурой гипотетической, хотя и имеются косвенные экспериментальные данные, свидетельствующие о его существовании и в какой-то мере характеризующие его [2]. Предполагается, что ДЦ содержит кластер положительно заряженных аминокислотных остатков, которые взаимодействуют с отрицательно заряженными остатками участка Аα-цепи ФГ, несколько удаленного от расщепляемой связи. Это взаимодействие приводит к конформационным изменениям фермента и субстрата, выражающимся в том, что расщепляемая связь занимает оптимальное для акта катализа положение по отношению к активному центру фермента [1, 3, 4]. При гидролизе низкомолекулярных субстратов ДЦ тромбина в реакцию не вовлекается; ориентация расщепляемой связи зависит от соответствия их структуры строению вторичных связывающих участков активного центра фермента. Родственные тромбину пищеварительные протеиназы широкого спектра действия подобным ДЦ регуляторным элементом не обладают [4].

Цель настоящей работы — проверить приведенную гипотезу в отношении справедливости предположения об ионной природе специфического взаимодействия ТР и ФГ вне активного центра.

Выяснить, участвуют ли в каком-либо процессе электростатические силы, можно, исследуя зависимость его от ионной силы ( $I$ ). При повышении ионной силы в среде подавляется формирование ионных связей между заряженными группами на поверхности реагирующих молекул. И если эти связи необходимы для данного процесса, то максимальная активность будет проявляться в условиях низкой ионной силы.

При работе с ТР, в частности при оценке его протеолитической активности по свертыванию ФГ, обычно применяются растворы с ионной силой, близкой к ее физиологическому значению ( $I=0,15$ ). Однако Ротолли и др. показали, что свертывающая способность ТР намного выше в условиях низкой ионной силы ( $I=0,05$ ) [5]. Рассматривается это явление с точки зрения оптимизации условий стабилизации и определения активности препаратов ТР. Но при интерпретации эффекта Ротолли следует учесть, что свертывание ФГ — сложный процесс; после отщепления фибриногенов тромбином наступает неферментативный этап — полимеризация (самосборка) фибрин-мономеров (ФМ) без участия ТР [6]. Авторы другой работы, также отметившие ускорение свертывания при уменьшении концентрации нейтральной соли в среде ниже  $I=0,1$ , предполагают, что происходит стимуляция полимеризации [7]. Систематически влияние ионной силы на процесс полимеризации было исследовано при значениях  $I \geq 0,1$  [8]. Однако данные об уменьшении растворимости ФГ при дальнейшем снижении ионной силы делают весьма вероятным ускорение спонтанной полимеризации в этих условиях [9]. Наконец, нельзя исключить влияния низкой ионной силы на собственно каталитический акт ТР, так как ему непосредственно предшествует связывание положительно заряженного бокового радикала субстрата с противоположно заряженным боковым радикалом в первичном кармане активного центра [10]. В этом отношении также нет четких данных, поскольку гидролиз низкомолекулярных субстратов ТР исследовали при значениях  $I$  выше 0,1 [11].

Учитывая эти обстоятельства, в работе были поставлены две основные задачи:

— сравнение влияния ионной силы на различные типы активности ТР, гипотетически отличающиеся по участию в них ДЦ;

— воспроизведение эффекта Ротолли при свертывании ФГ тромбином, определение влияния низкой ионной силы на различные этапы процесса.

**Материалы и методы.**  $\alpha$ -ТР выделяли из пасты фракции II+III по Кофу крови человека методом Фентона.  $\gamma$ -ТР получали из него аутолизом в 3 М NaCl при pH 8,0 и  $t=4^\circ\text{C}$  [12]. Свертывающая активность  $\alpha$ -ТР составляла 2 000—2 500 NIH ед/мг белка,  $\gamma$ -ТР — 15—20 NIH ед/мг белка.

ФГ из плазмы крови быка получали многократным переосаждением сернистым натрием [13]; ФМ — растворяя фибриновый сгусток в 0,02 М уксусной кислоте на холоду [14].

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически, принимая  $A_{1\text{см}, 280\text{ нм}}^{1\%}$  для  $\alpha$ - и  $\gamma$ -ТР 18,5 [15], ФГ и ФМ — 15,1 [16].

Свертывание ФГ тромбином и полимеризацию ФМ исследовали визуально (по времени образования фибринового сгустка) и спектрофотометрически [17], фиксируя величину лаг-периода перед нарастанием мутности на спектрофотометре Spescord UV-VIS при длине волны 320 нм. При действии ТР концентрация его в пробе составляла 0,01—0,2 NIH ед. на 1 мг ФГ. В случае ФМ реакцию инициировали разведением исходного 5 %-ного раствора ФМ в уксусной кислоте в 10—20 раз при добавлении в реакционную среду. Последняя содержала 0,02 М трис-HCl, pH 7,4, 0,66 % полиэтиленгликоль (ПЭГ) 6 000 [18] и NaCl в различной концентрации (от 0,01 до 1 М). Электропроводность служила контролем ионной силы реакционной среды. Для вышеуказанного раствора с 0,04 М NaCl она составляла 2,8 мСм, с 0,15 М NaCl — 15 мСм (со-

ответственно  $I$  равно 0,05 и 0,16). При расчете ионной силы принимали для 0,02 М трис-НСl, рН 7,4;  $I=0,01$  [19].

Казеинолитическую активность трипсина определяли по методу Кунитца [20].

Амидазную активность ТР и трипсина определяли по гидролизу трипептидного пара-нитроанилидного субстрата Tos-Gly-Pro-Arg-pNA в 0,05 М трис-НСl, рН 8,0, с равной концентрацией хлорида натрия;  $t=22^\circ\text{C}$ . Измеряли поглощение освобождающегося *p*-нитроанилина, принимая  $E \cdot M^{-1} \cdot \text{см} \cdot 405 \text{ нм} = 10\,000$ . Величину активности учитывали по начальной скорости гидролиза.

В работе использовали трипсин, казенин, трис, ПЭГ 6000 («Serva», ФРГ) и другие реактивы квалификации х. ч. отечественного производства. Тромбиновый субстрат Tos-Gly-Pro-Arg-pNA синтезирован в отделе химии белка Ин-та биоорг. химии и нефтехимии АН УССР Д. Н. Карой.

**Результаты и обсуждение.** Результаты определения зависимости свертывающей активности ТР от ионной силы среды (по времени образования фибринового сгустка) представлены на рис. 1. С наибольшей скоростью процесс происходит при  $I=0,06$  (31 с по сравнению с 80—90 с при 0,15 М, что соответствует 4-кратной разнице в активности, рассчитанной в стандартных НИН ед.). Таким образом, подтверждается эффект стимуляции свертывания в условиях низкой ионной силы.

Совсем иной характер зависимости от ионной силы среды имеет амидазная активность  $\alpha$ -ТР, определенная по гидролизу

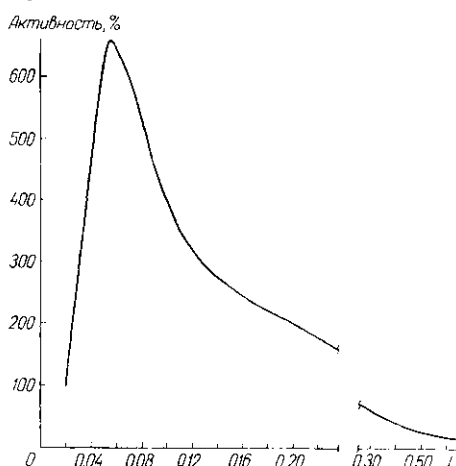


Рис. 1. Влияние ионной силы на свертывающую активность  $\alpha$ -ТР

Fig. 1. Effect of ionic strength on fibrinogen clotting by thrombin

хромогенного субстрата (рис. 2, а). При  $I=0,05$  активность минимальная; при повышении  $I$  — увеличивается. Подобная зависимость наблюдается и при гидролизе того же субстрата  $\gamma$ -ТР (рис. 2, б). Этот результат показывает, что образование солевой связи между Arg субстрата и Asp фермента в первичном кармане связывания в процессе катализа нечувствительно к изменению концентрации ионов у поверхности реагирующих молекул в данном диапазоне ионной силы. Вероятно, надежность упомянутой солевой связи для «хороших» субстратов в первую очередь обусловлена конфигурацией самого кармана связывания. С другой стороны, некоторое ингибирование по этому locusу при повышении концентрации ионов внешней среды может быть замаскировано созданием благоприятных условий для формирования кооперативных связей другого типа — гидрофобных взаимодействий между ферментом и субстратом во вторичной контактной зоне активного центра. Отсутствие эффекта низкой ионной силы при гидролизе низкомолекулярных субстратов в этих двух случаях указывает на то, что слабые электростатические взаимосвязи, характерные для специфического взаимодействия ТР и ФГ, образуются вне активного центра фермента. О том же свидетельствуют опыты с трипсином (рис. 3). Эффект низкой ионной силы при действии этого фермента на низкомолекулярный трипептидный и высокомолекулярный протеолитический (казенин) субстраты не обнаружен.

Согласно гипотезе о природе узкой специфичности ТР, дополнительный центр, ответственный за взаимодействие с ФГ, не участвует в гидролизе  $\alpha$ -ТР низкомолекулярных субстратов, а у  $\gamma$ -ТР и трипсина отсутствует совсем. Следовательно, различный ответ на снижение ион-

ной силы среды четырех типов активности, не связанных с ДЦ, и свертывающей способности  $\alpha$ -ТР ставит этот эффект в прямую зависимость от взаимодействия ТР с ФГ.

Далее предстояло выяснить, с какими именно этапами инициируемого тромбином свертывания ФГ и в какой степени связан наблюдаемый эффект. Визуальное наблюдение за образованием сгустка фиксирует начало заключительной стадии самосборки — желатинизации

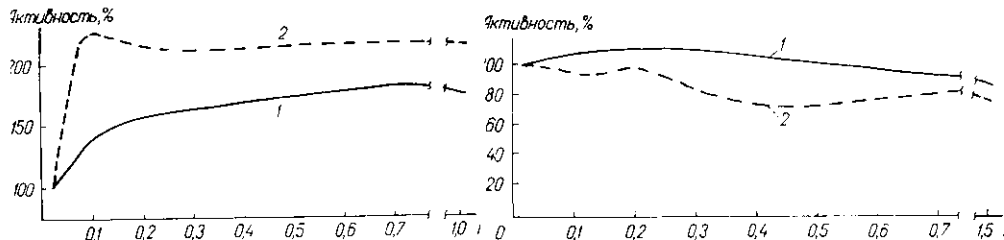


Рис. 2. Влияние ионной силы на амидазную активность  $\alpha$ -ТР (1) и  $\gamma$ -ТР (2) по гидролизу Tos-Gly-Pro-Arg-pNa

Fig. 2. Effect of ionic strength on hydrolysis of Tos-Gly-Pro-Arg-pNA by  $\alpha$ -thrombin (1) and  $\gamma$ -thrombin (2).

Рис. 3. Влияние ионной силы на амидазную (1) и протеолитическую (по гидролизу казеина) (2) активность трипсина

Fig. 3. Effect of ionic strength on amidolytic with Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (1) and proteolytic with casein (2) activity of trypsin

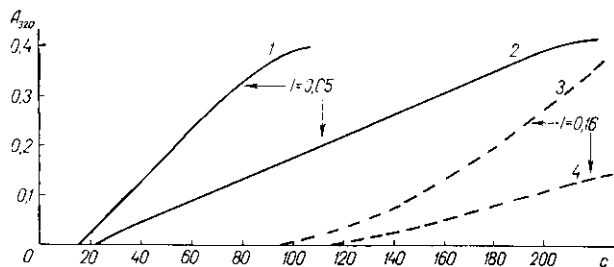


Рис. 4. Влияние ионной силы на лаг-фазу полимеризации при действии ТР на ФГ. Концентрация ФГ в растворе 0,5 мг/мл (кривые 1, 3) и 0,25 мг/мл (2, 4)

Fig. 4. Effects of ionic strength on the lag-period of turbidity time curves under fibrinogen clotting by thrombin. Fibrinogen concentration (mg/ml) is 0.5 (curves 1, 3) and 0.25 (curves 2, 4)

фибрин-полимера. При помощи спектрофотометрического метода можно зарегистрировать по появлению мутности более раннюю стадию — латеральную полимеризацию. Используя такой подход, мы показали, что при действии ТР на ФГ в условиях низкой ионной силы лаг-фаза (инкубационный период), когда оптическая плотность остается неизменной, значительно сокращена (рис. 4). Однако во время лаг-фазы, кроме протеолиза тромбином, происходит и начальная стадия полимеризации — образование протофибрилл путем продольной димеризации ФМ, которое еще не вызывает появления мутности. Для разграничения этих этапов параллельно со свертыванием ФГ тромбином изучали спонтанную полимеризацию ФМ. Последний представляет собой раствор мономерных составляющих фибрин-полимера в кислой среде, препятствующей полимеризации, и эквивалентен ФГ после отщепления фибринопептидов тромбином. В момент разведения ФМ начинается его свертывание, при котором так же, как и при действии ТР на ФГ, можно определить лаг-фазу по светопропусканию и время образования фибринового сгустка. Эксперименты проводили по схеме, представленной на рис. 5.

Результаты опытов приведены в табл. 1 и 2. Анализ их показывает, что низкая ионная сила стимулирует как ферментативный этап реакции, так и полимеризацию ФМ. Лаг-период полимеризации при действии ТР сокращается в условиях низкой ионной силы в такой же степени, как и образование сгустка (примерно в 4 раза). Протеолити-

ческий этап реакции оценивали по разнице между временем свертывания ФГ тромбином и ФМ так же, как между лаг-фазами смеси ФГ — ТР и ФМ. Хотя по абсолютной величине длительность ферментативного этапа, рассчитанная по данным двух методов, отличается, стимулирующий эффект низкой ионной силы подтвержден обоими методами и для всех исследованных концентраций ФГ (ФМ).

Полученные данные позволяют судить о вкладе отдельных этапов свертывания в эффект стимуляции низкой ионной силой. В значительной мере он зависит от ускорения стадии образования димерных протромбирилов. Это следует из факта отсутствия лаг-фазы при полимеризации ФМ в данных условиях при низкой ионной силе. Так как при

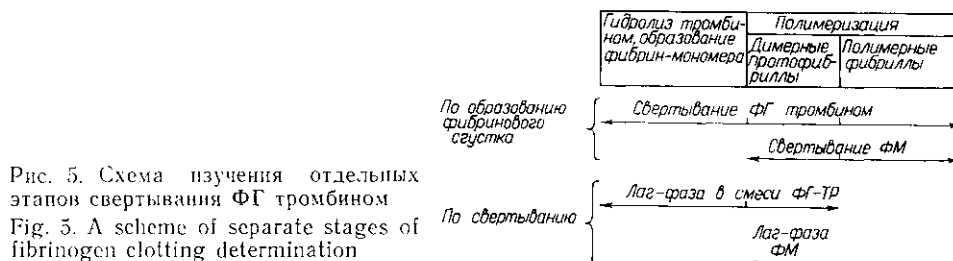


Рис. 5. Схема изучения отдельных этапов свертывания ФГ тромбином  
Fig. 5. A scheme of separate stages of fibrinogen clotting determination

определении по лаг-фазе с учетом этапа димеризации эффект ионной силы для ферментативного этапа меньше, чем по суммарному процессу (табл. 2), а при расчете по данным свертывания, включающим весь этап полимеризации, — больше (табл. 1), можно предположить, что поздние стадии полимеризации менее чувствительны к ионной силе, чем ферментативный этап и димеризация.

Таблица 1

Свертывание фибриногена (тромбином) и фибрин-мономера в условиях низкой ( $H:I=0,05$ ) и высокой ( $B:I=0,16$ ) ионной силы

Clotting times (in sec) of fibrinogen (under thrombin action) and fibrinmonomer in the conditions of low ( $L:I=0,05$ ) and high ( $H:I=0,16$ ) ionic strength

Концентрация ФГ (ФМ), мг/мл	I	$t_{\text{ФГ}}, \text{с}$	$(t_{\text{В}}/t_{\text{Н}})_{\text{ФГ}}$	$t_{\text{ФМ}}, \text{с}$	$t_{\text{ФГ}} - t_{\text{ФМ}} = t_{\text{ТР}}, \text{с}$	$(t_{\text{В}}/t_{\text{Н}})_{\text{ТР}}$
0,25	H	69	3,8	25	44	4,6
	B	264		61	203	
0,5	H	55	4,6	19	36	5,6
	B	253		52	201	
1,0	H	20	4,7	—	—	—
	B	94		—	—	—

Таблица 2

Лаг-фаза полимеризации (Л) смеси фибриноген — тромбин и фибрин-мономера в условиях низкой ( $H:I=0,05$ ) и высокой ( $B:I=0,16$ ) ионной силы

Lag-period of turbidity time curves under fibrinogen clotting by thrombin and self-assembly of fibrinmonomer in the conditions of low ( $L:I=0,05$ ) and high ( $H:I=0,16$ ) ionic strength

Концентрация ФГ (ФМ), мг/мл	I	$L_{\text{ФГ}}, \text{с}$	$(L_{\text{В}}/L_{\text{Н}})_{\text{ФГ}}$	$L_{\text{ФМ}}, \text{с}$	$L_{\text{ФГ}} - L_{\text{ФМ}} = t_{\text{ТР}}, \text{с}$	$(L_{\text{В}}/L_{\text{Н}})_{\text{ТР}}$
0,25	H	30	4,0	0	30	2,1
	B	122		59	63	
0,5	H	19	4,0	0	19	1,9
	B	80		44	36	
1,0	H	14	3,4	—	—	—
	B	47		—	—	—

Как указывалось выше, данные о влиянии ионной силы непосредственно на ферментативный этап свертывания ФГ тромбином в доступной нам литературе отсутствуют. Предположение о том, что на неферментативном этапе влияние ионной силы сильнее всего отражается на образовании димерных протофибрилл, согласуется с тем, что эта стадия считается лимитирующей скоростью реакции в процессе полимеризации [8] и чувствительнее к различным факторам среды, чем последующие.

Ускорение ферментативного этапа и полимеризации при снижении ионной силы, очевидно, имеет одинаковую природу — создание благоприятных условий для дальних электростатических взаимодействий. В работах В. А. Белицера и его школы развивается представление о том, что в самосборке фибрин-полимера важную роль играет формирование солевых связей между специфическими центрами полимеризации, открывающимися на поверхности ФГ вследствие протеолиза его тромбином [21]. Наши данные указывают на вероятность существования специфических участков на поверхности ТР и ФГ, обеспечивающих эффективность их взаимодействия с помощью электростатических сил на первом этапе свертывания ФГ, хотя непосредственно в каталитическом акте эти центры не участвуют. Таким образом, этот результат может служить еще одним аргументом в пользу гипотезы о дополнительном центре ТР, определяющем узкую специфичность его в отношении ФГ [1, 4].

Авторы выражают глубокую признательность Т. В. Варецкой за обсуждение материалов статьи.

#### THE EFFECT OF IONIC STRENGTH ON ENZYMATIC ACTIVITY OF THROMBIN

*I. V. Pehlunik, M. Yu. Selishcheva, A. A. Sereyskaya*

Institute of Bioorganic Chemistry Academy of Sciences  
of the Ukrainian SSR, Kiev

#### Summary

The dependence of human  $\alpha$ -thrombin and its non-clotting  $\gamma$ -form activity have been studied for their dependence on ionic strength of the medium relative to the action on fibrinogen and low-molecular tripeptide substrate. The previously found Rotoli effect of stimulation of fibrinogen clotting by thrombin with ionic strength much lower as against its physiological level (up to I 0.05) is confirmed. Acceleration of both fibrinogen proteolysis by thrombin and the non-enzymic stage of the process, namely, polymerization of fibrin monomer was shown to underlie this phenomenon. During the low-molecular substrate hydrolysis by both forms of thrombin and trypsin no low ionic strength stimulation was observed. The data obtained permit concluding that due to the ionic strength decrease the conditions favourable for thrombin specific interaction (outside its active centre) with fibrinogen by means of long distance electrostatic coupling between them are created.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fenton J. W. Regulation of thrombin generation and functions // *Sem. Thromb. Hemost.*— 1988.— **14**, N 3.— P. 234—240.
2. Prothrombin and thrombin / W. H. Seegers, H. J. Hassouna, D. Hewett-Emmett et al. // *Ibid.*— 1975.— **1**.— P. 211—283.
3. Strukova S. M., Sereyskaya A. A. On the two types of the thrombin high molecular substrates // *Thromb. Res.*— 1988.— **49**, N 2.— P. 303—304.
4. Струкова С. М., Серейская А. А., Осадчук Т. В. Структурные основы специфичности тромбина // *Успехи соврем. биологии.*— 1989.— **107**, № 1.— С. 41—54.
5. Rotoli B., Ogunsawno B., Scarpato N. Optimizing and stabilizing thrombin activity // *Haematologica.*— 1986.— **71**, N 6.— P. 463—466.
6. Позднякова Т. М. Механизм самосборки фибрина // *Биохимия животных и человека.*— 1989.— № 13.— С. 27—36.
7. Landis B. H., Koehler K. A., Fenton J. W. Human thrombins. Group IA, IIa salt-dependent properties of  $\alpha$ -thrombin // *J. Biol. Chem.*— 1981.— **256**, N 9.— P. 4604—4610.

8. Hantgan R., Hermans J. Assembly of fibrin. Light scattering study // J. Biol. Chem.—1979.—254, N 22.—P. 11272—11282.
9. Варецкая Т. В. Структура и свойства фибриногена и фибрина. Самосборка волокон фибрина: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.—Киев, 1977.—40 с.
10. Keil B. Trypsin // The enzymes; Ed. P. D. Boyer.—New York: Acad. press, 1971.—Vol. 3.—P. 249—275.
11. Roberts P. S., Hughes H. N., Fleming P. B. Effects of Hepes buffer on clotting tests, assay of factors V and VIII and on hydrolysis of esters by thrombin and thrombokinase // Thromb. and Haemost.—1976.—35, N 1.—P. 202—210.
12. Human thrombin: Preparative evaluation, structural properties, and enzymic specificity // J. W. Fenton, B. H. Landis, D. A. Walz et al. // Chemistry and physiology of human plasma proteins / Ed. D. H. Bing.—New York: Pergamon press, 1979.—P. 151—173.
13. Варецкая Т. В. Микрогетерогенность фибриногена: Кривофибриноген // Укр. биохим. журн.—1960.—32, № 1.—С. 13—27.
14. Варецкая Т. В. Получение фибрин-мономера и изучение некоторых его свойств // Там же.—1965.—36, № 4.—С. 194.
15. Human thrombins: production, evaluation, and properties of thrombin // J. W. Fenton, M. J. Fasco, A. B. Stackrow et al. // J. Biol. Chem.—1977.—252, N 11.—P. 3587—3598.
16. Lewis S. D., Shafer J. A. A thrombin assay based upon the release of fibrinopeptide A from fibrinogen: definition of a new thrombin unit // Thromb. Res.—1984.—35, N 2.—P. 111—120.
17. Steven F. S., Griffin M. M. Inhibition of thrombin cleavage of fibrinogen by polyestradiol phosphate; interaction with the crucial arginine residues in fibrinogen required for enzymic cleavage // Int. J. Biochem.—1982.—14, N 3.—P. 699—700.
18. Fusco M. J., Fenton J. W. II. Specificity of thrombin. I. Esterolytic properties of thrombin with derivatives of pNPGb // Arch. Biochem. and Biophys.—1973.—159, N 4.—P. 802—812.
19. Kull F. J., Vellekamp G. J., Button E. Ionic strengths and enzyme activities // TIBS.—1982, September.—P. 318.
20. Алексеевко Л. И. Методы определения активности протеолитических ферментов // Современ. методы в биохимии.—М.: Медицина, 1977.—С. 119—120.
21. Belitsker V. A., Varetskaja T. V., Malneva G. V. Fibrinogen-fibrin interaction // Biochim. et biophys. acta.—1968.—154, N 2.—P. 367—375.

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

Получено 28.08.89

NDK 535 577

© Н. П. Остапенко, Ю. А. Скрышевский,  
А. К. Гадацук, Ю. В. Рубин

## ПРИРОДА ДЕФЕКТНЫХ СОСТОЯНИЙ В КРИСТАЛЛАХ ОСНОВАНИЙ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Метод термостимулированной люминесценции применен для исследования дефектных состояний в кристаллах оснований нуклеиновых кислот (ОНК) различной степени чистоты, облученных УФ-светом в интервале 5—300 К или  $\gamma$ -лучами при 77 и 300 К. Обнаружены люминесценции носителей заряда в чистых кристаллах. На основе сравнения кривых термостимулирования (ТВ) кристаллов цитозина и его метилпроизводных и сопоставления их с результатами квантовохимических расчетов потенциалов ионизации таутомерных форм молекул цитозина сделан вывод о наличии таутомеров в исследованных кристаллах. В кристаллах цитозина моногидрата, облученных  $\gamma$ -лучами, обнаружены дефекты, образованные в результате взаимодействия молекул цитозина с продуктами радиолитической воды.

Кристаллы ОНК являются модельными объектами для изучения процессов радиационного повреждения, а также оптических и фотоэлектрических свойств сложных биологических систем. Экспериментальные данные о дефектах в этих кристаллах крайне малочисленны и получены в основном методами фотопроводимости и термостимулированной люминесценции (ТСЛ) [1—3]. Однако природа этих дефектов до сих пор оставалась неизвестной.

Установлено, что в свободном состоянии молекулы ОНК претерпевают различные таутомерные превращения, например, кетоенольные и амин-иминные [4, 5]. Данные о существовании таутомеров в кристаллах ОНК отсутствуют. Из рентгеноструктурных исследований извест-