

волжский региональный центр физико-химических исследований».

ЛИТЕРАТУРА

1. Badelin V.G., Tyunina E.Yu., Krasnov A.V., Tyunina V.V., Giricheva N.I., Girichev G.V. // Russ. J. Phys. Chem. A 2012. V. 86. N 3. P. 457-462.
2. Tyunina V.V., Krasnov A.V., Tyunina E.Yu., Badelin V.G., Girichev G.V. // J. Chem. Thermodyn. 2014. V. 74. P. 221-226.
3. Atavin E.G., Golubinskii A.V., Vilkov L.V., Kravchenko A.N., Lebedev O.V. // J. Struct. Chem. 2005. V. 46. N 3. P. 417-421.
4. Dunning T.H., Jr. // J. Chem. Phys. 1989. V. 90. N 2. P. 1007-1023.

УДК 547.963.3

С.В. Марутян, А.Л. Навасардян, Л.А. Навасардян

ВЛИЯНИЕ РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ДНК ДРОЖЖЕЙ, ОБЛУЧЕННЫХ ПРИ РАЗНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

(Ереванский государственный университет)
e-mail: marsed@ysu.am

*Осуществлено выделение ДНК из клеток дрожжей *C.guilliermondii* НП-4 и исследование изменений ее флюоресцентных параметров под воздействием рентгеновского облучения дрожжевых клеток при различных температурах. Показано, что облучение клеток при температуре 0 °С приводит к большей поврежденности двуцепочечной структуры ДНК, чем облучение при комнатной температуре, а в случае репарированной ДНК наблюдается дальнейшее увеличение поврежденности облученной ДНК.*

Ключевые слова: ДНК, рентгеновское облучение, репарация, флюоресценция

Эукариотические клетки реагируют на внешние факторы, в том числе и на облучение, посредством сложного механизма взаимодействующих сигнальных систем. Несмотря на проводимые в настоящее время многочисленные эксперименты, направленные на понимание всех сторон биологического действия облучения, пока не удается формировать единую картину повреждения и восстановления структуры ДНК.

Целью настоящей работы являлось выделение ДНК дрожжей и исследование изменений ее флюоресцентных параметров в условиях облучения и пострадиационной репарации клеток. Облучение клеток проводилось при температуре 0 °С с целью подавления активности ферментов, участвующих в процессе восстановления повреждений ДНК в течение облучения. Было осуществлено также выделение и сравнительное исследование флюоресцентных параметров ДНК из дрожжей, которые подвергались облучению при комнатной температуре, а облученные клетки затем оставлялись при температуре 0 °С на 1ч, когда, согласно литературным данным, значительно уменьшается степень поврежденности ДНК [1].

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования являлись дрожжевые клетки *C.gulliermondii* НП-4, выращенные в жидкой культуральной среде [2].

Облучение проводилось на рентгеновской установке Дрон 3. Напряжение на рентгеновской трубке составляло 27 кВ, анодный ток – 17 мА. Источником облучения послужил анод Сс, длина волны облучения составляла $1.54 \cdot 10^{-8}$ см, общая доза облучения - 45кР.

Выделение и очистка ДНК из дрожжевых клеток было осуществлено по модификации [2] метода Мармура [3].

Исследование флюоресцентных параметров ДНК было осуществлено на флюоресцентном спектрофотометре FluoroMax™. В качестве флюоресцентного зонда нами был использован бромистый этидий. Обработка данных и построение графиков было осуществлено с использованием программы DM3000F.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование флюоресцентных спектров ДНК, полученных до и после рентгеновского об-

лучения дрожжей, показали, что максимум спектра возбуждения для дрожжевой ДНК составляет $\lambda=285$ нм, с интенсивностью $I=3.5 \cdot 10^7$ кв/сек, а максимум спектра флюоресценции – $\lambda=314$ нм, с интенсивностью $I=2.2 \cdot 10^4$ кв/сек. Таким образом, получается, что интенсивность флюоресценции на 3 порядка ниже интенсивности возбуждения. По этой причине исследование собственной флюоресценции ДНК не дает существенной информации о структурном и функциональном состоянии исследуемых систем. С этой точки зрения в процессе исследования флюоресцентных параметров биологически важных макромолекул, в частности нуклеиновых кислот, принято использовать метод флюоресцентного зондирования. Флюоресцентные зонды – красители, которые взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами, связываясь с их внешней поверхностью или внедряясь в их двуцепочечную спираль путем интеркаляции. Вследствие такого взаимодействия меняются параметры флюоресценции красителя, что дает информацию о структурных особенностях исследуемой системы.

С целью исследования дрожжевой ДНК в качестве флюоресцентного зонда нами был использован бромистый этидий или 2,7-диамино-10-этил-9-дифенилфенантридий бромид, причем максимум спектра возбуждения комплекса ДНК-бромистый этидий составлял $\lambda=510$ нм, а максимум флюоресценции $\lambda=584$ нм.

Для выяснения изменений в двуцепочечной структуре ДНК при облучении было проведено исследование флюоресцентных параметров дрожжевой ДНК, подвергнутой рентгеновскому облучению в условиях постепенного нарастания концентрации бромистого этидия в растворе ДНК или, как этот метод принято называть в литературе, титрованием ДНК бромистым этидием. Полученные данные показывают, что для ДНК, выделенной как из необлученных, так и из облученных и подвергнутых пострадиационной репарации дрожжевых клеток, при постепенном повышении концентрации бромистого этидия в растворе ДНК наблюдается повышение интенсивности флюоресценции комплексов бромистый этидий-ДНК (БЭ-ДНК) до определенной концентрации красителя (рис.1), после чего при дальнейшем повышении концентрации бромистого этидия в растворе ДНК больше не наблюдается изменение в интенсивности флюоресценции.

Концентрация бромистого этидия, которая характеризует состояние полунасыщения ДНК красителем, для ДНК выделенной из необлученных клеток составляет $S_{БЭ}:C_{ДНК}=1:18$ (табл. 1), когда каждым 18 парам нуклеотидов ДНК соответствует одна молекула бромистого этидия. Для

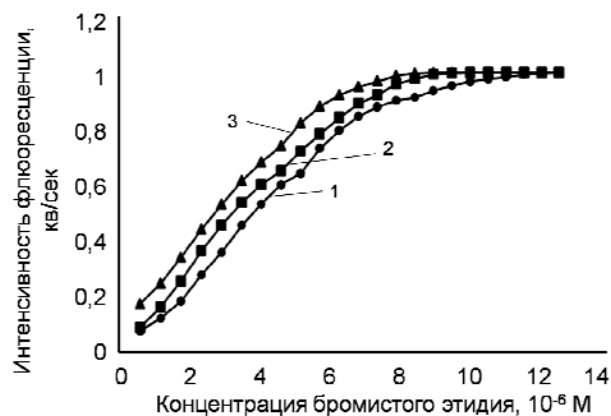


Рис. 1. Флюоресцентные параметры комплексов БЭ-ДНК дрожжей облученных при комнатной температуре: 1 – необлученная ДНК, 2 – облученная ДНК, 3 – репарированная ДНК

Fig. 1. Fluorescence parameters of complexes EB-DNA of yeasts irradiated at room temperature: 1 – non radiated DNA, 2 – X-radiated DNA, 3 – repaired DNA

Таблица 1

Флюоресцентные параметры комплексов бромистый этидий-ДНК дрожжей *S.guilliermondii*, подвергнутых облучению при комнатной температуре ($p<0.005$)

Table 1. Fluorescence parameters of complexes EB-DNA of yeasts irradiated at the room temperature ($p<0.005$)

	$S_{БЭ}, \times 10^{-6} \text{ M}$	$S_{БЭ}:C_{ДНК}$
Необлученная ДНК	4.53 ± 0.2	1:18
Облученная ДНК	2.8 ± 0.1	1:22
Репарированная ДНК	2.7 ± 0.11	1:24

Примечание: $S_{БЭ}$ – концентрация бромистого этидия в растворе, мкМ, $S_{БЭ}:C_{ДНК}$ – соотношение концентраций бромистого этидия и ДНК

Note: $S_{БЭ}$ – the concentration of ethidium bromide in a solution, μmol , $S_{БЭ}:C_{ДНК}$ – ratio of concentrations of ethidium bromide and DNA

облученной ДНК это состояние характеризуется значением $S_{БЭ}:C_{ДНК}=1:22$, а для репарированной ДНК - $S_{БЭ}:C_{ДНК}=1:24$. Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что ДНК, выделенная из облученных клеток, насыщается бромистым этидием быстрее, чем необлученная, а для репарированной ДНК скорость насыщения красителем самая высокая среди исследованных вариантов. Этот факт можно объяснить тем, что облученная ДНК носит структурные повреждения, в частности, однонитевые разрывы, что приводит к осложнению интеркаляции красителя, вследствие чего меньшее число молекул бромистого этидия связываются с ДНК и меняются флюоресцентные параметры комплексов ДНК-бромистый этидий. В случае репарированной ДНК возможно, что после процесса репарации в ДНК остались невосстановленные однонитевые разрывы, повреждения азотистых оснований, в том числе – ТТ-димеры, которые препятствуют внедрению бромистого эти-

дия в молекулу ДНК. Можно предположить также, что вследствие облучения возникают дефекты также и в процессе репарации, в частности, в ДНК-лигазном комплексе. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют, что в процессе репарации, помимо ожиданий, повышается степень поврежденности ДНК, и в репарированной ДНК имеется большее число структурных повреждений.

Для ДНК, облученной при низкой температуре (0 °С), также наблюдается насыщение ДНК бромистым этидием (рис. 2), а соотношение $C_{БЭ}:C_{ДНК}$ при состоянии полунасыщения ДНК красителем составляет 1:29 (табл. 2), что свидетельствует об увеличении поврежденности облученной ДНК по сравнению с облучением при комнатной температуре. После пострадиационной репарации дрожжей в этом случае соотношение $C_{БЭ}:C_{ДНК}$ равняется 1:31, что свидетельствует об увеличении числа повреждений ДНК в процессе репарации, как и при облучении дрожжей при комнатной температуре.

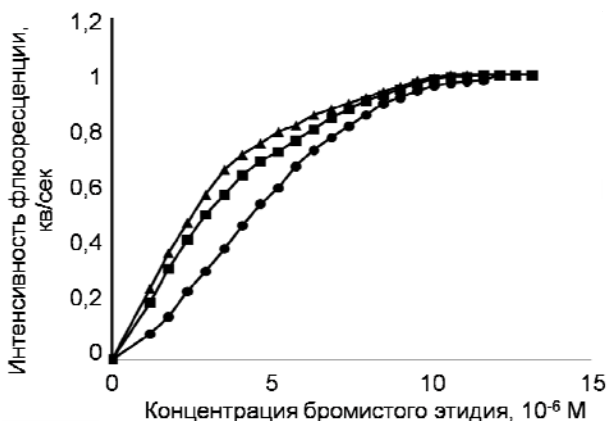


Рис. 2. Флюоресцентные параметры комплексов БЭ-ДНК дрожжей, облученных при температуре 0 °С: 1 – необлученная ДНК, 2 – облученная ДНК, 3 – репарированная ДНК
Fig. 2. Fluorescence parameters of complexes EB-DNA of yeasts irradiated at the 0 °С: 1 – non irradiated DNA, 2 – X-irradiated DNA, 3 – repaired DNA

В следующей серии экспериментов было проведено сравнительное исследование флюоресцентных параметров ДНК дрожжей, облученных при комнатной температуре и выдержанных в течение 1 ч при условиях, стимулирующих процесс репарации (среда с содержанием 100 mM глюкозы, 30 °С) (рис. 3). Полученные данные свидетельствуют (табл. 3), что для облученной ДНК соотношение $C_{БЭ}:C_{ДНК}=1:21$, а для репарированной ДНК – 1:39.

Таким образом, облучение при низкой температуре приводит к большей поврежденности двуцепочечной структуры ДНК, чем в случае облучения при комнатной температуре, так как при

Таблица 2
Флюоресцентные параметры комплексов бромистый этидий-ДНК дрожжей *C.guilliermondii*, подвергнутых облучению при температуре 0 °С (p<0.005)

Table 2. Fluorescence parameters of complexes EB-DNA of yeasts irradiated at the 0 °С (p<0.005)

	$C_{БЭ}, 10^{-6}M$	$C_{БЭ}:C_{ДНК}$
Необлученная ДНК	4.53±0.2	1:18
Облученная ДНК	2.83±0.08	1:29
Репарированная ДНК	2.65±0.06	1:31

Примечание: $C_{БЭ}$ – концентрация бромистого этидия в растворе, мкМ, $C_{БЭ}:C_{ДНК}$ – соотношение концентраций бромистого этидия и ДНК

Note: $C_{БЭ}$ -concentration of ethidium bromide in a solution μmol , $C_{БЭ}:C_{ДНК}$ – ratio of concentrations of ethidium bromide and DNA

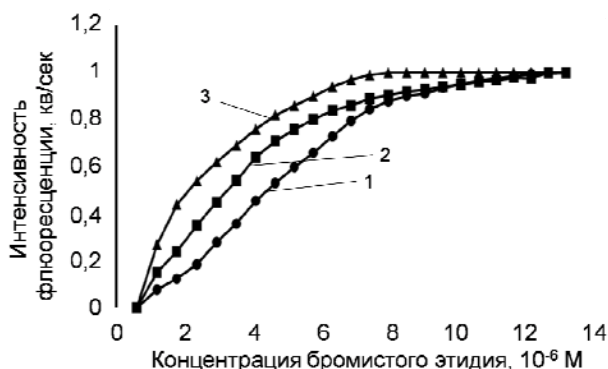


Рис. 3. Флюоресцентные параметры комплексов БЭ-ДНК дрожжей, облученных при комнатной температуре, выдержанных 1 ч при температуре 0 °С: 1 – необлученная ДНК, 2 – облученная ДНК, 3 – репарированная ДНК
Fig. 3. Fluorescence parameters of complexes EB-DNA of yeasts irradiated at the 0 °С and left at the room temperature for 1 h: 1 – non radiated DNA, 2 – X-radiated DNA, 3 – repaired DNA

Таблица 3
Флюоресцентные параметры комплексов бромистый этидий-ДНК дрожжей *C.guilliermondii*, подвергнутых облучению при комнатной температуре и оставленных на 1ч при температуре 0 °С (p<0.005)
Table 3. Fluorescence parameters of EB-DNA complexes of yeasts irradiated at the room temperature and left for 1 h at the 0 °С (p<0.005)

	$C_{БЭ}, \times 10^{-6}M$	$C_{БЭ}:C_{ДНК}$
Необлученная ДНК	4.53±0.2	1:18
Облученная ДНК	3.9±0.1	1:21
Репарированная ДНК	2.07±0.09	1:39

Примечание: $C_{БЭ}$ – концентрация бромистого этидия в растворе, мкМ, $C_{БЭ}:C_{ДНК}$ – соотношение концентраций бромистого этидия и ДНК

Note: $C_{БЭ}$ -concentration of ethidium bromide in a solution μmol , $C_{БЭ}:C_{ДНК}$ – ratio of concentrations of ethidium bromide and DNA

низкой темпеартуре, по всей видимости, подавляется активность ферментов репарации во время облучения. Что касается облучения при комнатной температуре, то возможно, что эти ферменты действуют уже во время облучения и успевают восстановить часть повреждений ДНК. Одноре-

менно в обоих исследованных вариантах наблюдается повышение степени поврежденности репарированной ДНК по сравнению с облученной. Возможно, что под влиянием облучения определенные изменения происходят в репарационной системе клетки, что приводит к дефектам репарационных ферментов. Вследствие этого может иметь место неправильная репарации повреждений ДНК или ферментативное допоражение ДНК, что, в свою очередь, приводит к двуцепочечным разрывам и к другим структурным повреждениям ДНК.

В случае, когда облученные клетки оставались при 0 °С на 1 ч, помимо ожиданиям происходит увеличение поврежденности ДНК, и при всех исследованных вариантах скорость насыще-

ния ДНК красителем наивысшая именно в этом случае. Этот факт можно объяснить дефектами в репарационной системе, в частности, нарушением ферментов участвующих в репарации поврежденной облученной ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Dražol V., Hutkova J.** // Folia Biol. 1972. V. 18. N 6. P. 424-433.
2. **Навасардян Л.А.** Влияние различных стрессовых факторов на белковые фракции и ДНК дрожжей. Дисс. ... д.биол.н. ЕГУ. Ереван. 2003. 197 с.; **Navasardyan L.A.** The influence of various stress factors on protein fractions and yeasts DNA. Doctor dissertation for biolog. science. ESU. Erevan. 2003. 197 p. (in Russian).
3. **Marmur J.J.** // Mol. Biol. 1961. V. 3. P. 208.

Кафедра биохимии

УДК 541.1+536.412+531.756

Г.И. Егоров, Д.М. Макаров, А.М. Колкер

ИЗБЫТОЧНЫЕ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СМЕСИ ВОДА + ЭТИЛЕНГЛИКОЛЬ ДО 100 МПа

(Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН)
e-mail: gie@isc-ras.ru

Рассчитаны изменения избыточных мольных термодинамических характеристик: энергии Гиббса $\Delta_{P_0 \rightarrow P} G_m^E$, энтропии $\Delta_{P_0 \rightarrow P} S_m^E$ и энтальпии $\Delta_{P_0 \rightarrow P} H_m^E$ смеси вода(1)+этиленгликоль(2) в интервале температур 278.15-323.15 К и давлений до 100 МПа. Зависимости $\Delta_{P_0 \rightarrow P} G_m^E$, $\Delta_{P_0 \rightarrow P} S_m^E$ и $\Delta_{P_0 \rightarrow P} H_m^E$ от мольной доли этиленгликоля (x_2) при всех значениях давления характеризуются наличием экстремумов. Обнаружена хорошая корреляция фазовой диаграммы и зависимости $\Delta_{P_0 \rightarrow P} S_m^E = f(x_2)$.

Ключевые слова: вода, этиленгликоль, смеси неэлектролитов, высокое давление, избыточные термодинамические характеристики, энтальпия смешения

Наличие развитой пространственной сетки водородных связей в воде и этиленгликоле (ЭГ) [1-9] предопределяет свойства их смесей. Специфика сетки Н-связей в любом растворителе зависит от соотношения межмолекулярных и внутримолекулярных водородных связей. Молекула ЭГ может образовывать 27 теоретически возможных конформеров [3,10-11], но в жидком ЭГ устойчивы только две конформации молекул: *гош*- (свернутая) и *транс*- (развернутая). При обычных условиях

более 90% молекул ЭГ находятся в виде *гош*-конформации [4,5,8], за стабилизацию которой ответственны внутримолекулярные водородные связи. В смесях с водой молекулы ЭГ также преимущественно находятся в виде *гош*-конформации, хотя уменьшение концентрации ЭГ в смеси повышает долю *транс*-конформаций [5,12].

Межмолекулярные взаимодействия в смеси вода-ЭГ вызывают пристальный интерес [2,4,5,12-19], вследствие наличия у нее важных