

УДК 635.652/577

Н. Г. КАРАПЕТЯН, К. К. КАРАМЯН, Е. Б. ДАЛЯН

### ЗАВИСИМОСТЬ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ДНК ФАСОЛИ ОТ СОДЕРЖАНИЯ $^{137}\text{Cs}$ И $^{40}\text{K}$

Проведен радиационный мониторинг фасоли (*Vicia faba*), отобранной из шести населенных пунктов, прилежащих к Армянской АЭС, выбор которых определялся направлением розы ветров в этом регионе. В качестве контроля использовалась фасоль, собранная в районе, отдаленном от АЭС на 60 км. Исследовали посевные качества семян, а также физиологию их прорастания.

Из проростков фасоли выделяли ДНК. Исследовались кривые плавления, энтальпия перехода спираль-клубок, спектры кругового дихроизма. Результаты исследований позволяют заключить, что наблюдаемые небольшие изменения содержания  $^{137}\text{Cs}$  и  $^{40}\text{K}$  в образцах фасоли, взятых из различных пунктов, не влияют на структуру ДНК.

Природные радиоактивные элементы, создающие ионизирующие излучения, – неотъемлемая часть среды обитания всего живого на Земле. Этот фон относительно невелик и составляет в среднем  $0,1 \text{ рад/год}$ . Основным источником загрязнения суши радионуклидами стали атомные электростанции и атомные теплоцентрали, которые не являются экологически абсолютно чистыми и постоянно выделяют в окружающее пространство различные радиоактивные вещества.

Наибольшую опасность для биосферы представляют  $^{90}\text{Sr}$  и  $^{137}\text{Cs}$ . Они хорошо растворимы в воде, легко поглощаются почвой, входят в состав трофических цепей и являются источниками внутреннего и внешнего облучения организмов. Радиоактивные выбросы из атомных реакторов поступают в атмосферу в виде газов и аэрозолей, переносятся потоками воздуха на большие расстояния и оседают на почву и растения. Известно, что даже при слабых дозах радиации прежде всего повреждается структура генеративных органов, что приводит к нарушению мейоза и микроспорогенеза, задержке оплодотворения, снижению полнозернистости семян и их всхожести. Сублетальные дозы вызывают почти полную гибель репродуктивных тканей [1]. Семена наиболее удобны для исследования влияния радиации, поскольку накопленные в них изменения находятся в скрытом состоянии и могут

проявляться как в процессе прорастания самих семян, так и в особенностях роста полученных из них растений на раннем этапе их онтогенеза.

Целью данного исследования было проведение радиационного мониторинга в зоне вокруг Армянской АЭС. Эта задача имеет как экологическое, так и народно-хозяйственное значение. Известно, что в регионе размещения АЭС возделываются бобовые культуры, которые известны как накопители радиоактивности и в то же время являются продуктом питания населения. Выявление возможных отрицательных воздействий хронического облучения малыми дозами на качество фасоли весьма актуально. В работе исследовалась фасоль урожая 2004 года, отобранная из шести населенных пунктов, прилежащих к Армянской АЭС. Их выбор определялся направлением розы ветров в этом регионе.

**Методы исследования.** Изучение посевных качеств семян проводили в лабораторных условиях: по 100 семян из каждого региона раскладывали в чашки Петри и проращивали в термостате при  $25-27^{\circ}\text{C}$  в течение пяти суток. На третьи сутки вычисляли энергию прорастания (в %) как отношение количества зерен, проросших за 72 часа, к общему количеству анализируемых зерен (по ГОСТу 10968–88). На пятые сутки вычисляли всхожесть семян (в %) как отношение количества зерен, проросших за 120 часов, к общему количеству анализируемых зерен. После этого измеряли линейно-весовые параметры роста сеянцев, усредняя данные четырех экспериментов.

Из сухих проростков фасоли получали геномную ДНК, используя универсальный метод выделения [2] с некоторыми модификациями. Материал растирали в ступке до тонкого порошка, добавляли буфер, содержащий  $0,4\text{ M NaCl}$ ,  $10\text{ mM}$  Трис- $\text{HCl}$ ,  $0,01\text{ M}$  ЭДТА с  $\text{pH } 8,0$ , и гомогенизировали. К гомогенату добавляли додецилсульфат натрия до концентрации 2%, протеиназу K (до конечной концентрации  $400\text{ мкг/мл}$ ). Смесь инкубировали 2 часа при  $55-60^{\circ}\text{C}$ . Лизат осторожно охлаждали под проточной водой и добавляли  $\text{NaCl}$  до конечной концентрации  $2\text{ M}$ , затем центрифугировали 30 минут при  $4\ 000\text{ об/мин}$ . К надосадку добавляли такой же объем смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1), встряхивали при  $4^{\circ}\text{C}$  и центрифугировали 30 минут с той же скоростью. Водную фазу отсасывали и осаждали ДНК двойным объемом холодного изопропанола. Смесь инкубировали 1 час при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Осадок ДНК промывали 70% этанолом. После очистки определяли оптические характеристики ДНК, которые соответствовали критериям чистоты по Мармуру [3].

УФ-спектры поглощения и спектрофотометрические кривые плавления ДНК снимались на спектрофотометре M-40 (Carl-Zeiss, Германия). Использовали термостатируемые кварцевые кюветы ( $10\text{ мм}$ ) с плотно притертыми тефлоновыми пробками. Нагрев осуществляли с линейной скоростью  $0,5\text{ град/мин}$  при помощи термоблока от прибора Unicam SP-800 (Англия). Измерения проводились в  $0,1\text{ SSC}$  ( $0,15\text{ M NaCl}+0,015\text{ M Na-цитрат}$ ) в интервале температур  $35-95^{\circ}\text{C}$ . Микрокалориметрические кривые плавления ДНК снимались на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4 (Россия). Спектры кругового дихроизма ДНК измеряли на дихрографе Roussel Jouan-II (Франция).

Уровень метилирования ДНК определяли по методу Ванюшина [4]. ДНК в закупоренных ампулах подвергали кислотному гидролизу в 98% растворе муравьиной кислоты при температуре 180°C 30–60 минут. После чего ампулы откупоривали и препараты разделяли методом бумажной хроматографии, оставляя 18 часов в растворителе, содержащем 60 мл бутанола, 10 мл воды и 0,1 мл аммиака. После хроматографии спектрофотометрически определяли содержание А, Т, Г, Ц и 5-метилцитазина (5 мС) в ДНК.

**Результаты и обсуждение.** Исследуемую территорию условно разделили на три зоны: зона I – в радиусе 1–3 км (пункт М-1), зона II – в 3–7 км (Ахавнатун, Мецамор, Мргашат), зона III – в радиусе 20 км (Ошакан, Нор-Армавир) от АЭС. В качестве контроля использовалась фасоль, собранная в районе, отдаленном от АЭС на 60 км. Роза ветров в регионе имеет следующее направление: Ошакан–Мецамор–Нор-Армавир.

Установлено, что растения поглощают цезий в 20 раз слабее, чем стронций. Однако при использовании минеральных удобрений поглощение ими  $^{90}\text{Sr}$  уменьшается, но при этом увеличивается поглощение  $^{137}\text{Cs}$ . Известно, что повышение содержания  $^{137}\text{Cs}$  в почве или в растениях в основном обусловлено выбросами с АЭС, т.к. в природе его содержание очень мало (на два порядка ниже значений, которые наблюдаются при выбросах со станций). В отобранном материале измеряли удельное содержание радионуклидов  $^{137}\text{Cs}$ , а также  $^{40}\text{K}$  [5, 6].

Изучались параметры посевных качеств семян (энергия прорастания, всхожесть, наличие пустых семян), позволяющие судить об их жизнеспособности. Результаты исследований приводятся в табл. 1.

Таблица 1

Показатели качества семян фасоли из различных населенных пунктов

Нас. пункты	Удельное содержание радионуклидов в семенах		Энергия прорастания, %	Всхожесть, %	Выход пустых семян, %
	$^{137}\text{Cs}$ , Бк/кг	$^{40}\text{K}$ , Бк/кг			
контроль	10	640	85	89	11
Ошакан	14	680	88	90	10
Ахавнатун	11	650	80	86	14
М-1	13	660	54	65	35
Мецамор	12	630	63	70	30
Мргашат	12	580	76	78	22
Нор-Армавир	9	610	89	92	8

Из полученных данных видно, что в зоне I (точка М-1) произошло снижение основных параметров роста сеянцев; в зоне II (в районе Мецамора), находящейся с подветренной стороны АЭС, наблюдалось небольшое снижение показателей качества семян; ростки фасоли, выращенные из семян III зоны, по своим показателям жизнеспособности были близки к контрольным.

Наряду с исследованием посевных качеств семян, мы изучали также физиологию прорастания семян, анализируя линейно-весовые параметры их роста (табл. 2).

Примерно такие же закономерности были выявлены по результатам формирования биомассы ростков фасоли. А именно, из семян, собранных в зоне I, были получены ростки с заниженными по сравнению с контролем линейно-весовыми параметрами роста (примерно в 0,83 и 0,65 раз); в зоне II наблюдалось небольшое подавление роста (в 0,86 и 0,76 раз по отношению к контролю); в зоне III были получены ростки со схожими по отношению к контролю параметрами роста.

Таблица 2

*Линейно-весовые параметры роста семян фасоли из различных населенных пунктов*

Нас. пункты	Средняя высота ростка		Средняя масса ростка	
	см	отношение к контролю	мг	отношение к контролю
контроль	7,2±0,1	1	809±0,15	1
Ошакан	7,5±0,15	1,04	855±0,2	1,06
Ахавнатун	7,4±0,1	1,03	900±0,25	1,11
М-1	6,0±0,15	0,83	530±0,15	0,65
Мецамор	6,2±0,20	0,86	620±0,15	0,76
Мргашат	6,7±0,20	0,93	660±0,15	0,82
Нор-Армавир	7,0±0,2	0,97	750±0,25	0,93

В литературе имеются данные о том, что в небольших дозах ионизирующая радиация оказывает стимулирующее действие на всхожесть семян, а большие дозы, наоборот, подавляют рост. Однако степень радиочувствительности семян у разных видов растений неодинакова. Она связана с цитологическими различиями семян, обусловленными количеством и размерами хромосом [7]. У бобовых известно наличие гигантских, политенных хромосом. Кроме того, обнаружено, что ДНК фасоли имеет различные палиндромные участки, которые образуют множество шпилек на молекуле [8].

Чтобы понять, чем обусловлены наблюдаемые нами небольшие отклонения параметров роста семян фасоли, затрагивают ли они геном клетки, была поставлена задача: выделить из полученного материала ДНК и исследовать возможные изменения в ее структуре. Она по своим оптическим характеристикам соответствовала литературным данным [3] и не содержала примесей РНК или белка.

Важнейшей задачей современной радиобиологии является изучение пусковых механизмов летального и мутагенного действия ионизирующего излучения. По современным представлениям, функцию управляющих систем осуществляют макромолекулы ДНК. Известно, что при облучении возникают дефекты в их структуре. Метод плавления ДНК (переход спираль-клубок) дает возможность выявить эти изменения. Температура плавления ( $T_m$ ), а также ширина температурного интервала перехода ( $\Delta T$ ) дают сведения не только о стабильности вторичной структуры ДНК, но и о числе дефектов в ней. В работах М.Д. Франк-Каменецкого показано, что при одних и тех же условиях проведения плавления ДНК величина  $\Delta T$  и  $T_m$  определяются длиной спиральных участков ДНК, причем наиболее объективную информацию о дефектах во вторичной структуре ДНК можно получить из дан-

ных по изменению  $\Delta T$ , а не  $T_m$ . Если  $\delta(\Delta T)^2 = (\Delta T_r)^2 - (\Delta T_o)^2$ , где  $\Delta T_o$  и  $\Delta T_r$  – соответственно интервалы температурного перехода контрольной и поврежденной ДНК, то  $\delta(\Delta T)^2$  соизмеримо с  $1/n=C$ , где  $n$  – средняя длина (в нуклеотидных парах) спиральных участков в молекуле ДНК,  $C$  – концентрация дефектов во вторичной структуре ДНК [9].

Воздействие ионизирующей радиации на ДНК может приводить к модификации структуры отдельных участков ДНК. Показано, напр. в [10], что малые дозы радиации вызывают внутри- и межцепочечные ковалентные сшивки в ДНК, что приводит к увеличению ее стабильности и, как следствие, к повышению  $T_m$ . Высокие дозы радиации приводят к разрыву одной или

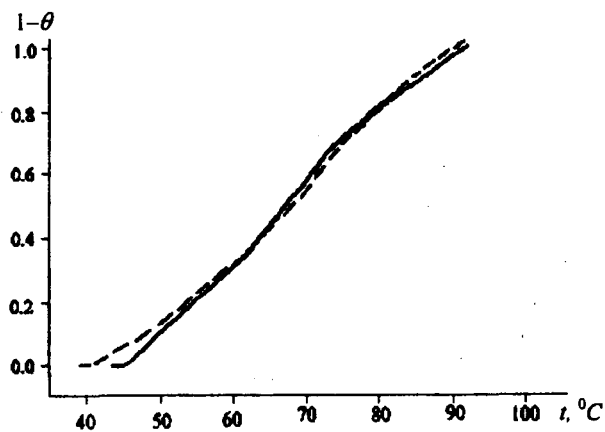


Рис. 1. Кривые плавления ДНК фасоли (показаны выборочно две кривые).  $\theta$  – степень спиральности.

двух нитей ДНК. Эти повреждения объясняются тем, что под действием радиации образовавшиеся продукты радиолиза воды, в частности ОН-радикалы, обладая большой реакционной способностью, атакуют двойную спираль ДНК. В результате нарушается целостность ее полинуклеотидных цепей. Таким образом ДНК дестабилизируется, что приводит к понижению  $T_m$ .

Полученные нами кривые плавления ДНК фасоли приводятся на рисунке 1.

В таблице 3 приведены значения параметров плавления ДНК фасоли из различных пунктов, прилежащих к АЭС.

Таблица 3

*Параметры плавления ДНК из проростков фасоли и уровень их метилирования*

Нас. пункты	$T_m, ^\circ C$	$\Delta T, ^\circ C$	Содержание 5mC, %
контроль	68,5	30	10,0
Ахавнатун	66,5	32,5	9,1
М-1	66	33,5	15,5
Мецамор	67	32	11,3
Мргашат	68,5	31	7,5
Нор-Армавир	68	30,5	8,2

Как видно из таблицы, параметры плавления ДНК фасоли из различных пунктов практически не отличаются от контрольных.

Поскольку не исключено, что под действием радиации могут модифицироваться вполне определенные локальные участки ДНК (АТ-, ГЦ- богатые участки, сателлитные фракции), были изучены также микрокалориметрические кривые плавления этих ДНК. Они также не выявили специфических

отличий между изучаемыми ДНК. На рисунке 2 приведена выборочная микрокалориметрическая кривая плавления ДНК фасоли.

По этой кривой было рассчитано значение энтальпии перехода спираль-клубок ДНК (12 ккал/моль).

Модификация первичной структуры ДНК может приводить к локальным изменениям конформации. Наиболее чувствительным методом изучения конформации ДНК является метод

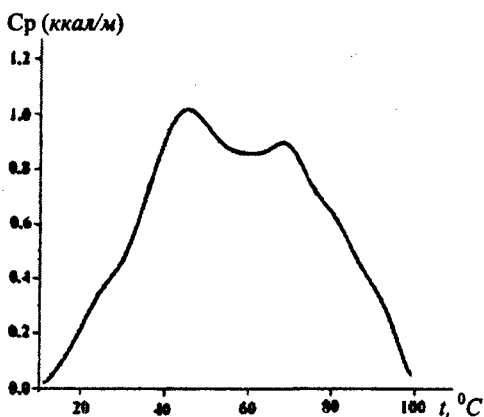


Рис. 2. Микрокалориметрическая кривая плавления ДНК фасоли. Ср – удельная теплоемкость при постоянном давлении.

кругового дихроизма (КД). Были исследованы спектры КД ДНК семян фасоли (рис. 3). Как видно из рисунка, исследуемые ДНК имели аналогичные спектры КД.

Параллельно проводилось исследование уровня метилирования выделенных ДНК. Метилирование остатков цитозина в ДНК является механизмом, обеспечивающим генетический контроль. Степень метилирования связана с формулой генома растения [11]. Известно, что прорастание сопровождается увеличением уровня метилирования ДНК.

Гиперметилирование ДНК при прорастании может рассматриваться как механизм клеточной дифференциации, т.к. является одним из условий включения и выключения отдельных генов [12]. Гипометилирование ведет к нарушению развития растений [13]. В таблице 3 приведены данные по содержанию 5-метилцитозина в выделенных ДНК. Полученные нами значения 5mC характерны для данного сорта фасоли. Увеличение степени метилирования ДНК в пункте М-1, возможно, имеет физиологический характер и может быть связано с адаптацией изучаемого сорта фасоли к данной местности. Некоторыми авторами при исследовании молекулярных аспектов адаптации растений к хроническому воздействию радиации было обнаружено гиперметилирование геномной ДНК [14].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что небольшие изменения в содержании  $^{137}\text{Cs}$  и  $^{40}\text{K}$  (в рамках фонового) в образцах фасоли, взятых из различных населенных пунктов, окружающих Армянскую АЭС, не влияют на структуру их ДНК.

*Работа выполнена при поддержке гранта МНТЦ А-773.*

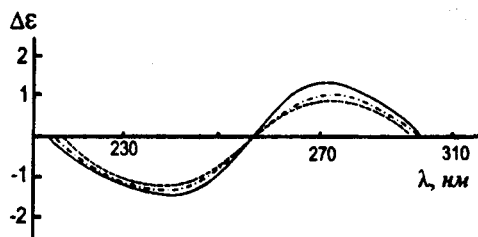


Рис. 3. Спектры КД ДНК, выделенных из ростков семян фасоли из зон I, II, III.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Козубов Г.М., Таскаев А.И. Проблемы экологического мониторинга. Матер. Рос. радиобиол. науч.-практ. конф. Брянск, 1991, ч. 2, с. 3-4.
2. Aljanabi S.M., Martinez I. – Nucleic Acids Res., 1997, v. 25, № 22, p. 4692-4693.
3. Marmur J. and Doty P. – J. Mol. Biol., 1961, v. 3, p. 208.
4. Ванюшин Б.Ф., Киринос М.Б. Геном растений. Под ред. К.М. Сытника. Киев, 1988, с. 105.
5. Кузнецов А.В. Радионуклиды в системе почва-растение. Влияние средств химизации на радиочувствительность почв сельскохозяйственных угодий и возделывание растений. М., 1984, с. 3-12.
6. Ананян В.Л. Геохимические пути миграции искусственных радионуклидов в биосфере. Тез. докл. IV конф. науч. совета при ГЕОХИ АН СССР по программе «АЭС-ВО». Гомель, 1990, с. 33.
7. Klmura S., Tahira Y., Ishibashi T., Mori Y., Mori T., Hashimoto J. and Sakaguchi K. – Nucleic Acids Res., 2004, v. 32, № 9, p. 2760-2767.
8. Guerra M. – Genet. and Mol. Biol., 2000, v. 23, № 4, p. 1029-1041.
9. Франк-Каменецкий М.Д. – Мол. биол., 1968, т. 2, вып. 3, с. 408-419.
10. Georgakilas A.G., Sakellou L., Sideris E.G., Margaritis L.H. and Sophianopoulou V. – Radiation Research, 1998, v. 150, p. 488-491.
11. Дрожденюк А.П., Сулимова Г.Е., Ванюшин Б.Ф. – Биохимия, 1977, т. 42, № 8, с. 1439-1444.
12. Bergman Y., Mostoslavsky R. – Biol. Chem., 1998, v. 379, p. 401-407.
13. Finnegan E.J., Gender R.K., Peacock W.J., Dennis E.S. – Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol., 1998, v. 49, p. 223-247.
14. Kovalchuk O., Pogribny I., Titov V., Arkhipov A., Kovalchuk I. – Plant Physiology, 2004, v. 135, p. 1-7.

Ն. Հ. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Կ. Կ. ԶԱՐԱՄՅԱՆ, Ե. Բ. ԴԱԼՅԱՆ

### ԼՈՐՈՒ ԴՆԹ-ի ՋԵՐՄԱԴԻՆԱՄԻԿ ՊԱՐԱՄԵՏՐԵՐԻ ԿՄՆԿԱԾՈՒԹՅՈՒՆԸ <sup>137</sup>Cs-ի ԵՎ <sup>40</sup>K-ի ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆՆԻՑ

#### Ամփոփում

Կատարվել է Հայաստանի ատոմակայանին հարակից վեց բնակելի պոնկտերից հավաքված լոբու (*Vicia faba*) ռադիացիոն մոնիտորինգ: Այդ պոնկտերը ընտրված են ըստ տվյալ ռեգիոնի քամիների մախընտրելի ուղղության: Ստուգիչի հետ համեմատելու համար օգտագործվել է ատոմակայանից 60 կմ հեռավորության վրա գտնվող տարածքից հավաքված լոբին: Հետազոտվել է հատիկների ծման որակը և աճի ֆիզիոլոգիան:

Լոբու ծիլերից անջատվել է ԴՆԹ: Ռիսունասիրվել են այդ ԴՆԹ-ների հալման կորերը, շրջանային դիքրոիզմի սպեկտրները և կծիկ-պարույր անցման էնթալպիան: Հետազոտման արդյունքները թույլ են տալիս եզրակացնել, որ Հայաստանի ատոմակայանին հարակից շրջաններից հավաքված լոբու նմուշներում <sup>137</sup>Cs-ի և <sup>40</sup>K-ի պարունակության ոչ մեծ փոփոխությունները չեն ազդում նրա ԴՆԹ-ի կառուցվածքի վրա:

DEPENDENCE OF THE BEAN DNA TERMODINAMIC PARAMETERS  
FROM THE  $^{137}\text{Cs}$  AND  $^{40}\text{K}$  CONTENTS

Summary

Radiation monitoring of the beans (*Vicia faba*) selected from six areas of Armenian NPP location regions was carried out. The choice of regions was determined by direction of the wind rose in this region. For control we used the bean from region 60 km away from NPP. We studied parameters of quality and growth physiology of the bean seeds.

DNA has been isolated from the sprouts. The melting profiles, enthalpy of helix-coil transition, spectra of circular dichroism of these isolated DNAs were investigated. The results of researches allow to conclude, that small changes on  $^{137}\text{Cs}$  и  $^{40}\text{K}$  contents in the beans samples from various regions do not influence on DNA structure.