



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 4(65), 2013

ԽՄՈՐԱՄՆԿԱՅԻՆ ԴՆԹ-Ի ՖԼՅՈՒՐԵՍԵՆՏԱՅԻՆ ՑՈՒՑԱՆԻՇՆԵՐԻ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆԸ ՌԵՆՏԳԵՆՅԱՆ ՃԱՌԱԳԱՅԹՄԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՄԲ

Ս.Վ.ՄԱՐՈՒԹՅԱՆ

Երևանի պետական լսարան, կենսաքիմիայի ամբիոն
marsed@ysu.am

Կատարվել է *Candida guilliermondii* խմորասնկային բջիջներից ԴՆԹ-ի անջատում և նրա ֆյուորեսցենտային ցուցանիշների փոփոխությունների ուսումնասիրություն բջիջները տարբեր ջերմաստիճանում ռենտգենյան ճառագայթման ենթարկելիս և հետճառագայթային ռեպարացիայի պայմաններում: Ցույց է տրվել, որ ցածր ջերմաստիճանում ճառագայթումը հանգեցնում է ԴՆԹ-ում երկշղթա կառուցվածքի ավելի մեծ վնասվածության, քան սենյակային ջերմաստիճանում ճառագայթելիս, իսկ ռեպարացված ԴՆԹ-ի դեպքում դիտվում է վնասվածության աստիճանի հետագա մեծացում:

Խմորասնկեր – ԴՆԹ – ռենտգենյան ճառագայթում – ֆյուորեսցենցիա

Осуществлено выделение ДНК из клеток дрожжей *Candida guilliermondii* и исследование изменений ее флюоресцентных параметров под воздействием рентгеновского облучения клеток при различных температурах. Показано, что облучение клеток при низкой температуре приводит к большей поврежденности двуцепочечной структуры ДНК, чем при комнатной температуре, а в случае репарированной ДНК наблюдается дальнейшее увеличение поврежденности ДНК.

Дрожжи – ДНК – рентгеновское облучение – флюоресценция

The isolation of DNA from yeasts *Candida guilliermondii* and investigation of changes in its fluorescence parameters under influence of X-radiation by different temperatures and postradiation repair were implemented. It has been shown that the radiation of cells by low temperature lead to more damages in double-stranded structure of DNA, than by room temperature, and in case of repaired DNA the further increase in DNA damages was observed.

Yeasts – DNA – X-radiation – fluorescence

Արտաքին ֆիզիկաքիմիական գործոններին, այդ թվում նաև իոնացնող ճառագայթմանը, բջիջները պատասխանում են փոխհամագործակցող ազդանշանային համակարգերի բարդ մեխանիզմի միջոցով: Չնայած ներկայումս բազմաթիվ փորձեր են տարվում՝ ուղղված ճառագայթման կենսաբանական ազդեցության բոլոր կողմերի ըմբռնմանը, դեռևս չի հաջողվել ձևավորել ԴՆԹ-ի վնասման և վերականգնման մեխա-նիզմների մեկ միասնական պատկեր:

Աշխատանքի նպատակն է եղել՝ խմորասնկերից ԴՆԹ-ի անջատումը և նրա ֆյուորեսցենտային ցուցանիշների փոփոխությունների ուսումնասիրությունը բջիջների ռենտգենյան ճառագայթման և հետճառագայթային ռեպարացիայի պայմաններում: Բջիջների ճառագայթումը կատարվել է 0°C պայմաններում՝ նպատակ ունենալով ճնշել ԴՆԹ-ի ճառագայթային վնասվածքների վերականգնման պրոցեսին մասնակցող ռեպարացիոն ֆերմենտների ակտիվությունը ճառագայթման ընթացքում:

Նյութ և մեթոդ: Հետազոտության օբյեկտ են հանդիսացել նավթային ածխաջրածիններ յուրացնող *Candida guilliermondii* խմորասնկային բջիջները, որոնք աճեցվել են հեղուկ սննդամիջավայրում [1]:

Խմորասնկային բջիջների ճառագայթահարումը. Ռենտգենյան խողովակի վրա կիրառված լարումը կազմել է 27 կՎ, անոդային հոսանքը՝ 17 մԱ: Ճառագայթման աղբյուր է հանդիսացել Cu-ի անոդը, ճառագայթման ալիքի երկարությունը՝ 1.54×10^{-8} մ, ճառագայթման ընդհանուր դոզան՝ 45 կՌ:

Խմորասնկային բջիջներից ԴՆԹ-ի անջատումը և մաքրումը իրականացվել է Մարմուրի մեթոդի [3] մոդիֆիկացիայով [2]:

ԴՆԹ-ի ֆյուորեացենտային ցուցանիշների ուսումնասիրությունը կատարվել է FluoroMax™ ֆյուորեացենտային սպեկտրոֆոտոմետրի օգնությամբ՝ որպես ֆյուորեացենտային զոնդ օգտագործելով էթիդիումի բրոմիդ (ԷԲ): Տվյալների մշակումը և գրաֆիկի կառուցումը կատարվել է DM3000F ծրագրի կիրառմամբ:

Արդյունքներ և քննարկում: Ստացված տվյալներից պարզվել է, որ ինչպես չճառագայթված, այնպես էլ՝ ճառագայթված և հետճառագայթային ռեպարացիայի ենթարկված խմորասնկային բջիջներից անջատված ԴՆԹ-ի դեպքում էԲ կոնցենտրացիայի աստիճանական բարձրացման պայմաններում դիտվում է ԴՆԹ- էԲ կոմպլեքսների ֆյուորեացենցիայի ինտենսիվության աճ՝ մինչև ներկանյութի որոշակի կոնցենտրացիան, որից հետո էԲ կոնցենտրացիան ավելացնելիս ֆյուորեացենցիայի ինտենսիվության աճ այլևս չի դիտվում: ԷԲ այն կոնցենտրացիան, որը բնութագրում է ԴՆԹ-ի մոլեկուլի հետ ներկանյութի կապման կիսահագեցած վիճակը, չճառագայթված խմորասնկային բջիջներից անջատված ԴՆԹ-ի համար (աղ.1) կազմել է $C_{\text{ԷԲ}}:C_{\text{ԴՆԹ}}=1:18$, երբ ԴՆԹ-ի յուրաքանչյուր 18 զույգ նուկլեոտիդին համապատասխանում է միջավայրում էԲ մեկ մոլեկուլ: Ցածր ջերմաստիճանում ռենտգենյան ճառագայթման ենթարկված տարբերակում էԲ-ԴՆԹ հարաբերությունը կազմում է $C_{\text{ԷԲ}}:C_{\text{ԴՆԹ}}=1:29$, ինչը վկայում է ճառագայթման ազդեցությամբ ԴՆԹ-ի երկրորդային կառուցվածքում առաջացած վնասվածքների մասին, որոնք հանգեցնում են նրա երկշղթա կառուցվածքի խախտման և ներկանյութի ներդրման խանգարման, որի հետևանքով էԲ ավելի քիչ թվով մոլեկուլներ են միանում ԴՆԹ-ին, և փոխվում է ԴՆԹ- էԲ կոմպլեքսի ֆյուորեացենտային պատկերը: Հետճառագայթային ռեպարացիայից հետո ԴՆԹ-ի կիսահագեցումը էԲ տեղի է ունենում $C_{\text{ԷԲ}}:C_{\text{ԴՆԹ}}=1:31$ դեպքում, այսինքն՝ ռեպարացված ԴՆԹ-ն ավելի շուտ է հագեցնում ներկանյութով, քան ճառագայթված բջիջներից անջատված ԴՆԹ-ն: Ստացված տվյալները վկայում են, որ ռեպարացիայի ընթացքում մեծանում է ճառագայթված ԴՆԹ-ի վնասվածության աստիճանը, և ռեպարացված ԴՆԹ-ն կրում է ավելի մեծ թվով վնասվածքներ:

Աղյուսակ 1. ԴՆԹ-ի ֆյուորեացենտային ցուցանիշները խմորասնկերի ճառագայթման տարբեր պայմանների դեպքում

Ճառագայթման պայմանները	Ճառագայթում սենյակային ջերմաստիճանում		Ճառագայթում 0°C ջերմաստիճանում	
	C _{ԷԲ}	C _{ԷԲ} :C _{ԴՆԹ}	C _{ԷԲ}	C _{ԷԲ} :C _{ԴՆԹ}
Չճառագայթված ԴՆԹ	4.53x10 ⁻⁶ M	1:18	4.53x10 ⁻⁶ M	1:18
Ճառագայթված ԴՆԹ	2.8 x10 ⁻⁶ M	1:22	2.83 x10 ⁻⁶ M	1:29
Ռեպարացված ԴՆԹ	2.7 x10 ⁻⁶ M	1:24	2.65 x10 ⁻⁶ M	1:31

Ստացված տվյալները վկայում են, որ ցածր ջերմաստիճանում ճառագայթումը հանգեցնում է ԴՆԹ-ում երկշղթա կառուցվածքի ավելի մեծ վնասվածության, քան սենյակային ջերմաստիճանում ճառագայթելիս, քանի որ ցածր ջերմաստիճանում, հավանաբար, ճնշված է ռեպարացիոն ֆերմենտների ակտիվությունը ճառագայթման պահին: Իսկ սենյակային ջերմաստիճանում ճառագայթելիս այդ ֆերմենտները գործել են արդեն ճառագայթման ընթացքում և հասցրել են վերականգնել ԴՆԹ-ի վնասվածքների մի մասը: Միաժամանակ դիտվում է ռեպարացված ԴՆԹ-ի վնասվածության աստիճանի մեծացում ճառագայթված ԴՆԹ-ի համեմատությամբ: Հնարավոր է, որ ճառագայթման ազդեցությամբ որոշակի փոփոխություններ են տեղի ունենում բջիջ ռեպարացիոն համակարգում՝ պայմանավորված ռեպարացիոն ֆերմենտների վնասումներով, որը հանգեցնում է ԴՆԹ-ի վնասվածքների սխալ ռեպարացիայի կամ ֆերմենտային վերավնասման և, հետևաբար, ԴՆԹ-ի երկշղթա խզումների և այլ կառուցվածքային վնասվածքների առաջացման:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Նավասարդյան Լ.Հ., Դավթյան Մ.Ա. Խմորասնկային բջիջների սպիտակուցային փոխանակության մաս-սպեկտրաչափական ուսումնասիրության սկզբունքներ (ուսումնամեթոդական ձեռնարկ), Երևան, ԵՊՀ հրատարակչություն, էջ 8-10, 1985:
2. Նավասարդյան Լ.Հ., Մարության Մ.Վ. Խմորասնկային բջիջներից հիստոնային սպիտակուցների և ԴՆԹ-ի անջատումը և ֆյուորեացենտային ցուցանիշների համեմատական ուսումնասիրումը (ուսումնամեթոդական ձեռնարկ), Երևան, ԵՊՀ հրատարակչություն, 2006:
3. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. J. Mol. Biol. 3, p.208-218, 1961.

Մտացվել է 09.01.2013