


МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

На правах рукопису

ГРИГОР'ЄВ ДМИТРО МИКОЛАЙОВИЧ



ВПЛИВ ІОНІВ МЕТАЛІВ НА СТРУКТУРУ ДНК В УМОВАХ РІЗНИХ
ЗОВНІШНІХ ДІЙ

Спеціальність 01.04.25-біофізика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фізико-математичних наук

ХАРКІВ 1997

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00751953 (U)

му інституті низьких
їни

Науковий керівник: доктор фізико-математичних наук, професор БЛАГОЙ Юрій Павлович
кандидат фізико-математичних наук, старший науковий співробітник КОРНІЛОВА Светлана Вікторівна

Офіційні опоненти:

1. Доктор фіз.-мат. наук
Димант Леонід Наумович
2. Доктор фіз.-мат. наук
Семьонов Михайло Олексійович

Провідна організація: Інститут проблем кріобіології та кріомедицини Національної академії наук України, м.Харків

Захист дисертації відбудеться «26» 06 1997 р. о 15⁰⁰ годині на засіданні Спеціалізованої ради Д 02.02.13 Харківського державного університету, 310077, м.Харків, пл. Свободи, 4.

З дисертацією можна ознайомитися у Центральній науковій бібліотеці Харківського державного університету

Автореферат розісланий «23» 05 1997 р.

Вчений секретар Спеціалізованої вченої ради, кандидат біологічних наук

Гаташ С. В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Взаємодія іонів металів з ДНК відіграє фундаментальну роль у клітинних процесах. Іони сумісно з водою стабілізують структури РНК і ДНК, визначають рівновагу між різними формами їх вторинної структури, впливають на переходи спіраль-клубок. Іони металів також приймають участь в процесах мутагенезу та канцерогенезу. Значення досліджень дії іонів металів на біополімери стає особливо важливим в зв'язку з забрудненням оточуючого середовища важкими металами і радіоактивними елементами. Високі константи зв'язування багатовалентних іонів з біополімерами і надмолекулярними структурами обумовлюють значне перевищення концентрації іонів в організмі в порівнянні з оточуючим середовищем. У випадку сумісної дії іонізуючого випромінювання і іонів металів останні можуть чинити радіосенсибілізуючий або протекторної вплив залежно від їх концентрацій та здібності зв'язуватись з клітинними елементами. Однак молекулярні механізми цих ефектів взагалі невідомі і потребують вивчення на різних рівнях організації клітини.

Іони металів також відіграють важливу роль при зберіганні генетичного матеріалу, тому що при виморожуванні води їх концентрація суттєво підвищується в зоні локалізації біомолекул, що може привести до пошкодження останніх. Кріопротектори, які використовуються при кріоконсервації, зв'язуючи воду, також впливають на взаємодію іонів металів з біомолекулами.

Таким чином вивчення впливу іонів металів на структуру і конформацію ДНК в умовах різних зовнішніх дій, таких як іонізуюче випромінювання і зміна складу розчинника - вельми важлива задача для з'ясування молекулярних механізмів впливу іонів металів та означених дій на структуру ДНК.

Об'єкт та предмет дослідження. Об'єктом дослідження є комплекси біологічно активних іонів Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} з ДНК, ДНК виділена з тварин, що піддавались сумісній дії іонів Zn^{2+} , Cu^{2+} і іонізуючого випромінювання в умовах ЧАЕС, а також ДНК в змішаних розчинниках.

Мета роботи полягає в тому, щоб на підставі отриманих експериментальних даних показати адекватність застосування моделі рівноважного зв'язування для опису взаємодії іонів металів з ДНК, а також на підставі

уявленнь цієї моделі пояснити механізм впливу іонів металів на структуру ДНК в умовах різних зовнішніх дій.

При виконанні роботи вирішувались такі завдання:

1. Вивчення впливу іонів Ca^{2+} , Mn^{2+} і Cu^{2+} на термодинамічні параметри переходу спіраль-клубок ДНК в широкому інтервалі концентрацій цих іонів в умовах низького вмісту іонів Na^+ та при високих концентраціях ДНК. Оцінити константи зв'язування цих іонів з ДНК в даних умовах. Порівняння отриманих результатів з вже існуючими. Вибір моделі, яка найбільш адекватно описує взаємодію іонів металів с ДНК.
2. Дослідження впливу іонів Na^+ і Ca^{2+} на зміну гідродинамічних та конформаційних параметрів ДНК в змішаних розчинниках.
3. Дослідження впливу іонів Cu^{2+} і Zn^{2+} на стабільність структури і макромолекулярні параметри ДНК тварин, що піддавалися дії тривалого хронічного випромінення в умовах ЧАЕС.

Наукова новизна визначається результатами, що входять в основні положення, які виносяться на захист:

- вивчено вплив іонів Ca^{2+} , Mn^{2+} і Cu^{2+} на термодинамічні параметри переходу спіраль-клубок ДНК в широкому інтервалі концентрацій цих іонів в умовах низької іонної сили розчину та при високих концентраціях ДНК. Оцінено константи зв'язування цих іонів з ДНК в даних умовах.

Показано, що модель рівноважного зв'язування та теорія «скріпок» адекватно описують вплив іонів металів на термодинамічні параметри переходу спіраль-клубок в ДНК в широкому інтервалі концентрацій ДНК. Застосування моделі рівноважного зв'язування та теорії «скріпок» до опису впливу іонів металів на термодинамічні параметри переходу спіраль-клубок ДНК дає змогу пояснити існуючий розбіг в експериментальних даних.

Показано внесок існуючих в присутності іонів металів агрегаційних ефектів в процес переходу спіраль-клубок ДНК.

Встановлено, що ДНК, виділена з тканин тварин, що піддавалися дії тривалого хронічного випромінення в умовах ЧАЕС характеризується великим вмістом іонів металів, а також наявністю низькомолекулярної фракції,

вміст якої підвищується з віком та поколінням тварин. Високомолекулярна фракція ДНК характеризується зменшенням молекулярної маси та зростанням кількості одноститкових пошкоджень в порівнянні з контролем. Ці ефекти посилюються з віком та поколінням тварин.

Встановлено, що іони міді та цинку посилюють пошкодження, які виникають в ДНК тварин в умовах ЧАЕС. Викликані цими іонами зміни корелюють з величиною їх констант зв'язування з ДНК.

Показано вплив іонів Na^+ і Ca^{2+} на гідродинамічні і конформаційні параметри ДНК в присутності органічних речовин, зв'язуючих воду (ДМСО, 1,2-пропандіол, гліцерин).

Практична цінність роботи. Отримані в роботі нові експериментальні дані про вплив іонів металів та тривалого іонізуючого випромінювання в умовах ЧАЕС на ДНК тварин можуть служити основою розробки методик оцінки пошкодження геному під дією іонізуючого випромінювання та іонів металів, а також для прогнозування наслідків цих пошкоджень. Дані про вплив іонів металів на гідродинамічні та конформаційні параметри ДНК в присутності таких широко використовуваних криопротекторів як ДМСО, 1,2-пропандіол та гліцерин можуть знайти застосування в методиках криоконсервації та зберіганні генетичного матеріалу в кріобанках.

На захист виносяться такі положення:

1. Модель рівноважного зв'язування та теорія «скріпок» адекватно описують встановлені експериментальні залежності температури плавлення ДНК від концентрації іонів двохвалентних металів (Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}) як в умовах розбавлених, так і концентрованих розчинів ДНК.

Константи зв'язування іонів Mn^{2+} , Ca^{2+} і Cu^{2+} з ДНК залежать від концентрації іонів Na^+ зв'язаних з молекулою біополімеру.

2. Результати вимірів характеристичної в'язкості ДНК $[\eta]$ при різних значеннях іонних сил розчину свідчать про немонотонний характер зміни $[\eta]$ біополімера від концентрації 1,2-пропандіолу, ДМСО, гліцерину. При цьому зміна макромолекулярних параметрів ДНК визначається об'ємними внутрішньомолекулярними взаємодіями і не супроводжується суттєвою денатурацією ДНК. Встановлені

залежності параметру виключеного об'єму від концентрації вивчених сполучень.

3. При дії радіації в умовах Чорнобильської зони, ДНК, виділена з тканин тварин характеризується суттєвим вмістом низькомолекулярної фракції, одно- і дwonитковими дефектами, а також значним вмістом металів (Zn, Se, Cu, Fe и др.)

4. Результати віскозиметричних вимірів ДНК тварин, що піддавалися сумісній дії іонів металів (Cu^{2+} , Zn^{2+}) і іонізуючого випромінення в умовах Чорнобильської зони свідчать про зростання числа одnonиткових пошкоджень біополімера при зростанні часу дії металів. Цей ефект зумовлен зв'язуванням металів з азотистими основами ДНК, дестабілізацією її структури, що посилює дію радіації. При цьому ефект міді сильніший за ефект цинку.

5. Експериментальні залежності теплоємності ДНК від температури в широкому інтервалі концентрацій іонів двоxвалентних металів свідчать, що в процесі переходу спіраль-клубок частина внутрішніх зв'язків ДНК, стабілізуючих 2-xспіральну структуру, передаються агрегаційним зв'язкам. При цьому для Mn^{2+} , Ca^{2+} и низьких концентрацій міді перехід йде по схемі: виплавлення «внутрішніх» зв'язків → утворення «агрегаційних» → «плавлення» агрегаційних. При високому вмісті іонів міді такий процес йде як виплавлення зв'язків «агрегаційних» → «внутрішніх» → «агрегаційних».

Головні результати роботи були апробовані на:

Об'єднаному з'їзді Європейського товариства радіаційної біології та Європейського товариства гіпотермічної онкології (Амстердам, 1994), IV Міжнародній науково-технічній конференції «Чорнобиль-94» (Зелений Мис, 1994.), III Міжнародній конференції "Сучасний прогрес в кріобіології" (Харків, 1995), Міжнародній конференції «Цитотоксичний, мутагенний та канцерогенний потенціал важких металів, які зв'язані з оточуючим середовищем людини» (Польща, 1996), V Міжнародна конференція «Застосування фізики в медицині і біології» (Італія, 1996), Радіобіологічний з'їзд, (Україна, 1993), Науково-медичні аспекти наслідків аварії на ЧАЕС: Підсумки 8-річного обстеження, лікування і моніторингу ліквідаторів аварії та населення України (Україна, 1994 р.), I. Український з'їзд біофізичного товариства, (Україна, 1994).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 5 статей, в тому числі в журналах, які реферуються.

Структура і об'єм роботи. Дисертація складається із вступу, п'яти розділів, закінчення і переліку використаної літератури з 218 пунктів. Роботу викладено на 197 сторінках, вона містить 44 малюнки та 12 таблиці.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

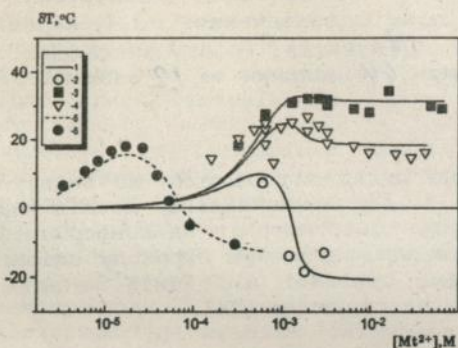
У першому розділі подано огляд літератури, що висвітлює сучасні теоретичні і експериментальні дослідження, присвячені проблемі впливу іонів металів на конформаційні параметри ДНК, термодинамічні параметри переходу спіраль-клубок в ДНК та проблеми сумісної дії іонів металів і іонізуючого випромінення на структуру ДНК.

У другому розділі описані методи вискозиметрії і мікрокалориметрії, які використовувались для вирішення поставлених задач. Приведені характеристики препаратів ДНК і їх розчинів. В роботі використовувались диференціальний скануючий мікрокалориметр ДАСМ-4, який дозволяє реєструвати теплові ефекти розтягнутих по температурі процесів внутрішніх молекулярних перетворень біологічних речовин, а також їх парціальну теплоємність, як функцію від температури і низькоградієнтний ротаційний вискозиметр типу Зімма-Крозерса, який дозволяє визначати характеристичну в'язкість макромолекул.

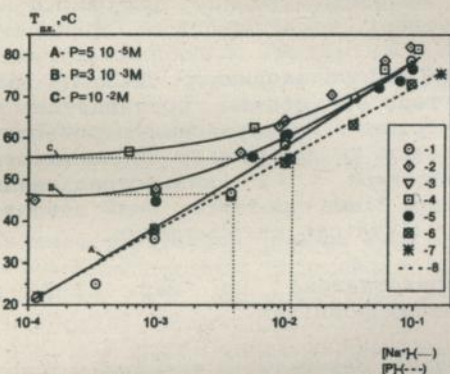
Одержані результати представлено на мал. 1-9 та обговорено у третьому-п'ятому розділах.

У третьому розділі подані результати термодинамічного дослідження зв'язування ДНК з іонами Mn^{2+} , Cu^{2+} и Ca^{2+} . Отримано залежності теплоємності переходу спіраль-клубок ДНК від температури, ентальпії і температури плавлення ДНК від вмісту іонів в розчині в широкому інтервалі концентрацій цих іонів, при високих концентраціях ДНК і в умовах низького вмісту іонів Na^+ (10^{-3} М). Як можна бачити (мал.1), теорія "скріпок" та модель рівноважного зв'язування адекватно описують вплив іонів металів на перехід спіраль-клубок ДНК, а також дозволяють пояснити існуючий розбіг в експериментальних даних отриманих різними методами (мал.2) та в широкому інтервалі значень концентрації біополімеру (10^{-5} - 10^{-1} М). Оцінені значення констант зв'язування і параметру коперативності

зв'язування іонів Mn^{2+} , Cu^{2+} и Ca^{2+} з ДНК при концентрації ДНК $3 \cdot 10^{-3}$ М.



Мал.1 Залежність δT_m комплексу ДНК з іонами металів від концентрації іонів в розчині. 1-залежність, розрахована по теорії «скріпок» ($P=3 \cdot 10^{-3}$ М); 2- Cu^{2+} ; 3- Ca^{2+} ; 4- Mn^{2+} ; 5-залежність розрахована по теорії «скріпок» ($P=3 \cdot 10^{-5}$ М) [1]; 6- Cu^{2+} [2].

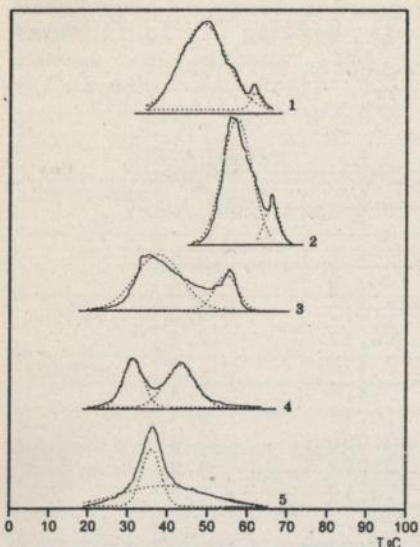


Мал. 2 - Залежність T_m від концентрації іонів Na^+ в розчині (без врахування протіоіонів, які вносяться з ДНК), розрахована для різних концентрацій ДНК. 1- T_m (при $P \approx 5 \cdot 10^{-5}$ М (УФ-спектроскопія, [3]). 2- T_m при $P \approx 3 \cdot 10^{-3}$ М (калориметрія [4]). 3- T_m при $P \approx 3 \cdot 10^{-3}$ М (калориметрія). 4- T_m при $P \approx 10^{-2}$ М (калориметрія, [5]). 5- T_m при $P \approx 2,5 \cdot 10^{-5}$ М (спектрофотометрія, [6]). 6-безсолевий розчин ДНК (калориметрія). 7- T_m при $P \approx 1,7 \cdot 10^{-1}$ М (калориметрія, [7]). 8-Залежність T_m від концентрації ДНК розрахована для безсолевого розчину.

Проведено оптимізаційне представлення отриманих залежностей теплоємності переходу спіраль-клубок комплексів ДНК з іонами Mn^{2+} , Cu^{2+} и Ca^{2+} від температури в вигляді двох гауссових кривих (мал.3).

На підставі аналізу еволюції двох модельних складових процесу плавлення ДНК (мал.4) при зміні концентрації іонів металів та уявлень робіт [8, 9] запропонована модель плавлення основних і агрегаційних зв'язків комплексів ДНК-метал.

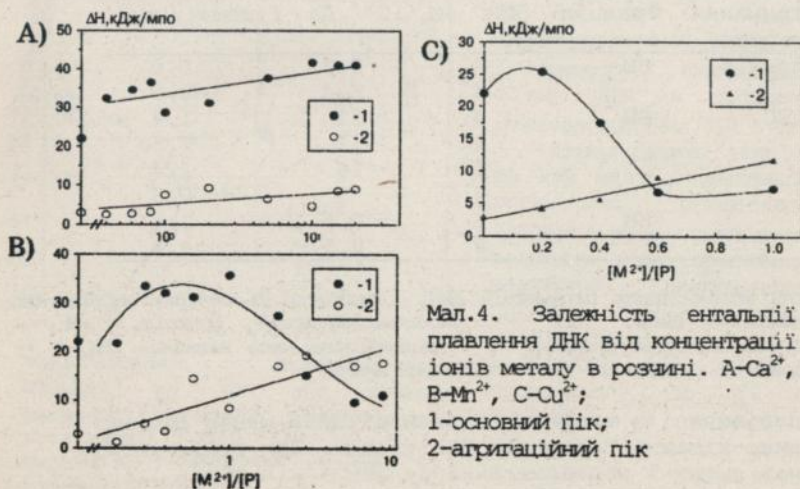
Припускається що, в процесі переходу спіраль-клубок частина внутрішніх водневих зв'язків ДНК, стабілізуючих 2-хспіральну структуру, передається агрегаційним зв'язкам.



Мал.3. Розклад експериментальних кривих на гауссові складові. 1-ДНК; 2-ДНК+0,2 Cu^{2+}/P ; 3-ДНК+0,4 Cu^{2+}/P ; 4-ДНК+0,6 Cu^{2+}/P ; 5-ДНК+0,2 Cu^{2+}/P

При цьому перехід здійснюється по схемі: для іонів Mn^{2+} і Ca^{2+} при концентраціях $[\text{Mt}^{2+}]/[\text{P}] \leq 20$ і для іонів Cu^{2+} при концентраціях $[\text{Mt}^{2+}]/[\text{P}] < 1$ при підвищенні температури відбувається виплавлення внутрішніх зв'язків і створення агрегаційних, а потім «плавлення» останніх. При $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}]=1$ такий процес може бути представлений як виплавлення зв'язків:

«агрегаційні» →
 «внутрішні» →
 «агрегаційні».



Мал.4. Залежність ентальпії плавлення ДНК від концентрації іонів металу в розчині. А- Ca^{2+} , В- Mn^{2+} , С- Cu^{2+} ; 1-основний пік; 2-агрегаційний пік

У четвертому розділі розглядаються результати дослідження сумісної дії іонів металів і іонізуючого випромінювання на структуру ДНК тварин в умовах Чорнобильської АЕС. Проведено порівняння дії іонів Cu^{2+} и Zn^{2+} на структуру ДНК тварин в цих умовах (табл.1 і 2).

Таблиця 1.

Місце отримання тварин	Фракція	Вік	$M_n \cdot 10^{-7}, \text{Да}$	$f, \text{пoшк./мoл.}$
Харків	ВМ	4	5,5	0,0
		4*	4,8	1,0
ЧАЕС	ВМ	4	2,7	0,0
		4*	0,17	2,5
		6	4,5	1,8
		6*	2,6	4,4
	НМ	4	0,17	0,7
		4*	0,036	2,3
		6	0,077	0,0
		6*	0,19	1,0

Зміни молекулярних параметрів ДНК, виділеної з печінки щурів, які споживали мідь. ВМ - високомолекулярна фракція, НМ - низькомолекулярна фракція, M_n -- молекулярна маса нативної ДНК, * -- тварини що отримували їжу з домішками міді.

Таблиця 2.

Місце отримання тварин	Фракція	Вік	$M_n \cdot 10^{-6}, \text{Да}$	$f, \text{пoшк./мoл.}$
Харків	ВМ	4	3,2	0,0
		4*	6,4	0,0
ЧАЕС	ВМ	4	21	1,4
		4*	13	1,5
		6	16	2,4
		6*	3	0,0
	НМ	6	0,5	1,4
		6*	0,5	4,4

Зміни молекулярних параметрів ДНК, виділеної з печінки щурів, які споживали цинк. ВМ - високомолекулярна фракція, НМ - низькомолекулярна фракція, M_n -- молекулярна маса нативної ДНК, * -- тварини що отримували їжу з домішками цинку.

В порівнянні з впливом іонів міді цинк менш діє на фізико-хімічні параметри ДНК тварин. При сумісній дії іонів цинку і радіації виникає менша кількість низькомолекулярної ДНК і одониткових пошкоджень. Цей

результат корелює зі значеннями констант зв'язування іонів Zn і Cu з ДНК ($K_{Cu} > K_{Zn}$).

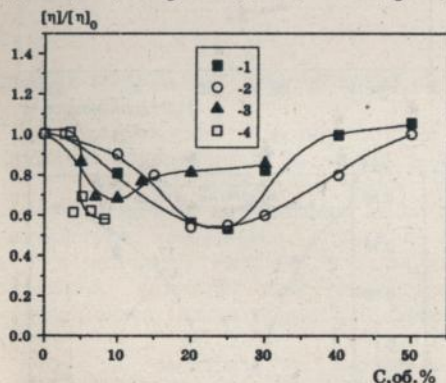
Запропоновано модель пошкодження ДНК радіонуклідами і можливого механізму виникнення низькомолекулярної фракції, вміст якої зростає з віком та поколінням тварин (табл. 3).

Таблиця 3.

Покоління	Орган	Вік (міс.)		
		3	6	12
F ₆	П	—	59 (61)	95
	С	—	33	48
F ₇	П	52 (59)	98	—
	С	37	—	—
Контроль	П		4-6	
	С		2,2	

Доля низькомолекулярної фракції ДНК (мол. %) для препаратів з печінки (П) і селезінки (С) тварин різного віку та кількох поколінь.

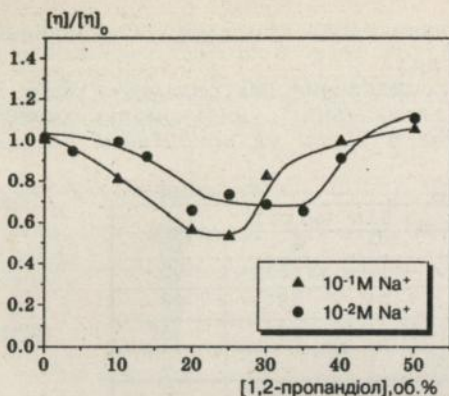
У п'ятому розділі досліджується дія іонів Na⁺ і Ca²⁺ на гідродинамічні і конформаційні параметри ДНК в змішаних розчинниках. Представлені залежності характеристичної в'язкості ДНК від концентрації речовин, що зв'язують воду (ДМСО, 1,2-пропандіол, гліцерин, трет-бутанол) (мал.5).



Мал.5. Залежність характеристичної в'язкості $[\eta]$ ДНК від об'ємної концентрації органічних розчинників при концентрації Na⁺ 10^{-1} М. 1- 1,2-пропандіол; 2- ДМСО; 3- гліцерин; 4- трет-бутанол [10].

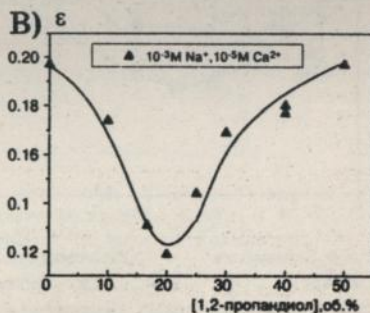
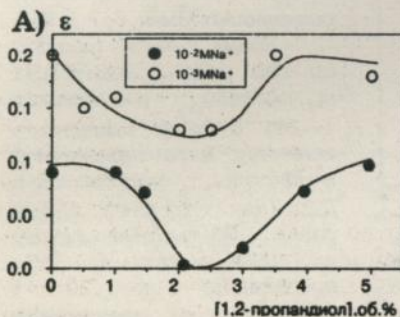
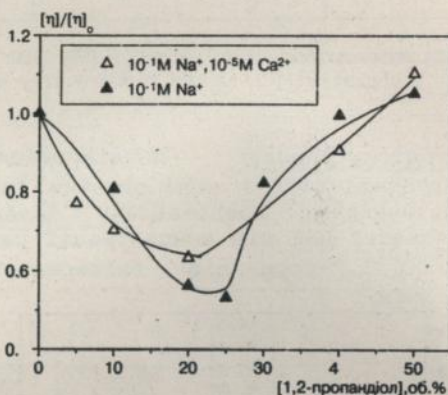
Показана роль іонів Na⁺ і Ca²⁺ в зміні характеристичної в'язкості і параметру виключеного об'єму ДНК в змішаних розчинниках (мал.6,7 і 8).

Можна бачити (мал.5), що вже малі концентрації органічних розчинників (~10%) суттєво зменшують величину характеристичної в'язкості макромолекул ДНК (для гліцерину в 1,5 рази). Збільшення вмісту як ДМСО, так і 1,2-пропандіолу до 20 % приводить к зменшенню величини $[\eta]$ в 1,7 рази. Подальше збільшення концентрації ДМСО и 1,2-пропандіолу (30% і вище),



Мал.6. Залежність величини $[\eta]$ ДНК від об'ємної концентрації 1,2-пропандіолу при концентрації 0,1 М і 0,01 М NaCl

Мал.7. Залежність відношення характеристичної в'язкості ДНК в змішаному розчиннику до значення характеристичної в'язкості ДНК в буферному розчині (NaCl, NaAc), в присутності іонів Ca^{2+} і при концентрації іонів Na^+ 10^{-1} М, від об'ємної концентрації 1,2-пропандіолу.



Мал.8. Залежність параметру виключеного об'єму ДНК ϵ від концентрації 1,2-пропандіолу А) - 0,1 М Na^+ і 0,01 М Na^+ ; В) 10^{-3} М Na^+ , 10^{-5} М Ca^{2+} .

а глицерину 15% і вище, викликає зростання характеристичної в'язкості макромолекул ДНК, при цьому у випадку 1,2-пропандіолу ефект є більш значним.

Немонотонний характер залежності $[\eta]$ і ϵ від концентрації органічних розчинників зумовлений двома ефектами: зростанням констант зв'язування іонів металів з ДНК при пониженні активності води і зменшенням діелектричної проникності розчину (ϵ'). Це підтверджується зменшенням падіння характеристичної в'язкості зі зниженням концентрації іонів Na^+ в розчині. Величина $[\eta]$ в розчині 0,01 М Na^+ зменшується менш інтенсивно при добавленні 1,2-пропандіолу, і її мінімум досягається при 30% 1,2-пропандіолу. Зростання характеристичної в'язкості ДНК при збільшенні концентрації 1,2-пропандіолу вище 30% для розчину, який містить 0,01 М Na^+ , йде швидше (мал. 6).

Поведінка $[\eta]$ ДНК зумовлена в випадку високої іонної сили розчину конкуренцією двох процесів: подавленням дальніх електростатичних взаємодій в ланцюгу ДНК за рахунок активізації зв'язування іонів металів (Na^+ , Ca^{2+}) з макромолекулою і зростання ефективності електростатичної внутрішньої молекулярної взаємодії при зменшенні ϵ' розчину.

ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ТА ВИСНОВКИ

В заключенні сформульовані основні результати та висновки, одержані в дисертаційній роботі:

1. За допомогою методу диференціальної скануючої мікрокалориметрії отримано дані по залежності ентальпії і температури плавлення ДНК від вмісту іонів (Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}) в розчині, які можуть служити основою для перевірки модельних уявлень про структуру комплексів металів з нуклеїновими кислотами і конформаційних перетворень в них.

При аналізі експериментальних залежностей теплоємності переходу спіраль-клубок комплексів ДНК з іонами Cu^{2+} , Mn^{2+} та Ca^{2+} від температури встановлено посилення тонкої структури кривих плавлення зі зростанням концентрації іонів. Спостерігається розширення інтервалу переходу при малих концентраціях іонів металів, яке змінюється різким звуженням при подальшому підвищенні вмісту іонів.

Показано, що теорія "скріпок" адекватно описує перехід спіраль-клубок комплексів ДНК з іонами Cu^{2+} , Mn^{2+} та Ca^{2+} як в умовах розбавлених ($[\text{P}] \sim 6 \cdot 10^{-5}$ М), так і більш концентрованих розчинів ($[\text{P}] \sim 3 \cdot 10^{-3}$ М) біополімеру. При аналізі взаємодії ДНК з іонами металів необхідно враховувати іони, які вносяться з макромолекулами.

Встановлено, що при збільшенні концентрації біополімера ($[\text{P}] \sim 3 \cdot 10^{-3}$ М) значення констант зв'язування іонів Mn^{2+} , Ca^{2+} і Cu^{2+} узгоджується з величинами, отриманими методом УФ-спектроскопії для розбавлених розчинів ($[\text{P}] \sim 6 \cdot 10^{-5}$ М), але при такому ж вмісті Na^+ .

2. При зростанні концентрації іонів металів спостерігається зростання високотемпературного агрегаційного піку на експериментальних залежностях теплоємності переходу спіраль-клубок металокомплексів ДНК від температури. Аналіз залежностей ентальпії основного та агрегаційного піку від вмісту іонів металів в розчині показує, що в процесі переходу спіраль-клубок металокомплексу ДНК частина внутрішніх зв'язків, стабілізуючих 2-хспіральної структуру ДНК, передається агрегаційним зв'язкам, можливість реалізації яких зростає зі зростанням концентрації іонів і залежить від констант зв'язування з денатурованою ДНК. При цьому перехід здійснюється по схемі: для іонів Mn^{2+} і Ca^{2+} при концентраціях $[\text{M}^{2+}]/[\text{P}] \leq 20$ і для іонів Cu^{2+} при концентраціях $[\text{M}^{2+}]/[\text{P}] < 1$ при підвищенні температури відбувається виплавлення внутрішніх зв'язків і створення агрегаційних, а потім «плавлення» останніх. При $[\text{Cu}^{2+}]/[\text{P}] \approx 1$ такий процес може бути зображений як виплавлення зв'язків: «агрегаційні» \rightarrow «внутрішні» \rightarrow «агрегаційні» (в схемі представленні зв'язки, які вносять основний вклад в процес плавлення).

3. Встановлені закономірності зміни характеристичної в'язкості $[\eta]$ і параметру виключеного об'єму ϵ від концентрації речовин (1,2-пропандіол, ДМСО, гліцерин), зв'язуючих воду. При концентрації ДМСО і 1,2-пропандіолу, рівній 20%, характеристична в'язкість зменшується в 1,7 раза. Збільшення концентрації ДМСО і 1,2-пропандіолу до $\geq 30\%$ викликає зростання $[\eta]$. Структурні перебудови при цьому не супроводжуються суттєвою денатурацією ДНК. Немонотоний характер залежності $[\eta]$ і ϵ від концентрації 1,2-пропандіолу і ДМСО зумовлений двома ефектами: зростанням констант зв'язування іонів металів з ДНК при пониженні активності води і зменшенням діелектричної

проникності розчину (ϵ'). Поведінка $[\eta]$ ДНК зумовлена у випадку високої іонної сили розчину конкуренцією двох процесів: подавлення дальніх електростатичних взаємодій в ланцюгу ДНК за рахунок активізації зв'язування іонів металів (Na^+ , Ca^{2+}) з макромолекулою та зростання ефективності електростатичної внутрішньої молекулярної взаємодії при зменшенні ϵ' розчину.

4. Встановлено, що ДНК, виділена з тварин, які піддавались дії іонізуючого випромінювання в умовах Чорнобильської зони, характеризується значним вмістом металів (Fe , Cu , Zn , Se , Sr и Cd), наявністю низькомолекулярної (НМ) фракції, кількість якої зростає з віком та поколінням тварин, а також зменшенням з віком та номером покоління молекулярної маси високомолекулярної (ВМ) фракції ($M \sim 10^6-10^7$ Да) і зростанням кількості її одониткових пошкоджень.

Показано, що структура ДНК тварин, що піддавались сумісній дії іонів металів (Cu^{2+} , Zn^{2+}) і іонізуючого випромінювання в умовах Чорнобильської зони, в значній мірі порушується. Встановлено, що зразки ДНК, виділені з печінки щурів зони ЧАЕС, які споживали мідь характеризуються значним вмістом низькомолекулярної фракції, а також збільшенням числа одониткових розривів - в 2,5 рази у чотирьохмісячних і в 4 рази у шестимісячних тварин. ДНК, що виділена з селезінки цих тварин мала в 1,5 рази більше одониткових пошкоджень, в порівнянні з контролем.

Таким чином, надмірний вміст металів може являтися однією з причин накопичення пошкоджень в молекулах ДНК і утворення значної кількості НМ ДНК. Збільшення кількості НМ ДНК і зменшення молекулярної маси ВМ ДНК зумовлені накопиченням прихованих дефектів які проявляються в вигляді одно- та дуниткових пошкоджень в молекулах при їх виділенні.

Ефект зростання числа одониткових дефектів біополімеру зі зростанням часу дії міді обумовлений тим, що іони міді, маючи великі константи асоціації з ДНК, особливо з основами нуклеїнових кислот ($\sim 10^5$), суттєво впливають на структуру макромолекул, аж до їх денатурації, що посилює дію радіації. В порівнянні з впливом іонів міді цинк менш діє на фізико-хімічні параметри ДНК дослідних тварин, що корелює зі значеннями їх констант зв'язування з ДНК. При сумісній дії іонів цинку і радіації виникає менша кількість низькомолекулярної ДНК і одониткових пошкоджень.

Результати дисертації опубліковано в таких роботах:

1. С. В. Корнилова , В. С. Леонтьев , А. Г. Шкорбатов , Ю. П. Благой , А. В. Козлов, Д. Н. Григорьев Изучение действия криопротекторов на макромолекулярные параметры ДНК. Проблемы криобиологии, 1993, N 4, с. 20-25.
2. Ю. П. Благой , С. В. Корнилова , В. С. Леонтьев, В. А. Сорокин , Г. О. Гладченко , В. А. Валеев , Д. Н. Григорьев, Л. Е. Капинос Изменение свойств ДНК животных при хроническом воздействии ионизирующего излучения, Доклады академии наук Украины, 1993, N10.
3. С. В. Корнилова, Ю. П. Благой, В. С. Леонтьев, В. А. Сорокин, Г. О. Гладченко, В. А. Валеев, Д. Н. Григорьев, Л. Е. Капинос, В. Н. Бондаренко, В. Ю. Колод. Структурные и физико-химические свойства ДНК из тканей животных, подвергшихся хроническому облучению в Чернобыльской зоне. Биофизика, 1994, т.39, Вып.4, с.637-645.
4. Ю. П. Благой, В. М. Индык, С. В. Корнилова, Д. Н. Григорьев, К. Кропачева, В. С. Леонтьев, Е. Мишурова, Я. И. Серкиз. Действие ионизирующего излучения и ионов меди на ДНК животных. Доклады академии наук Украины 1996, N 2.
5. С. В. Корнилова, В. С. Леонтьев, Ю. П. Благой, Д. Н. Григорьев, Я. И. Серкиз, Е. Мишурова, К. Кропачева. Изучение эффекта синергизма при комбинированном действии ионов металлов и ионизирующего излучения на структуру ДНК животных 30-км зоны ЧАЭС. В книге «Результаты 8 летних исследований в Чернобыльской зоне» 1994, Киев, с.896-901.
6. П. Ясем , Я. Тотова, Д. Н. Григорьев. Вплив йонів металів (Ca^{2+} , Mn^{2+}) на енергетику переходу спіраль-клубок. Матеріали 1-ого з'їзду Українського Біофізичного товариства, 20-24 червня, 1994, с.256

ЛИТЕРАТУРА

1. Lazurkin Yu. S, Frank-Kamenetskii M. D., Trifonov E. N. Biopolimers. 1970. 9, №6, p. 1253-1306
2. Благой Ю. П., Сорокин В. А., Валеев В. А. и др. Молекуляр. биология. 1978. 12, вып. 4. С. 795-805.
3. Благой Ю. П., Сорокин В. А., Божко Г. Х. и др. Stud. biophys.- 1977.- 65, № 1.- С. 55 - 67.
4. Власов А. П., Сиякин А. И., Андрианов В. Т. Вестн АН СССР. Сер. хим. наук.- 1988.- № 3.- С. 70 - 74.

5. G.R. Getashvili et al., Stud. biophys., 1976, N 2, 89-95.
6. A.T. Karapetian et al., J. Biomol. Struct. & Dyn., 1990, V. 8, N 1, 131-138.
7. J.G. Duguid, V. A. Bloomfield, J. M. Benevides et al. Biophysical J., 1996, V. 71, N 6, p. 3350-3360.
8. V.YA. Maleev, A. I. Gasan. Biopolymers. 1974, V. 13, P. 2409-2422.
9. Duguid J. G., Bloomfield V. A., Benevides J. M. et al. Biophysical Journal. 1995. V. 69. P. 2623-2641
10. А. Н. Веселков, Е. В. Фрисман. Молекулярная биология. 1979, Т.13, № 1, с. 184-191.

АННОТАЦИЯ

Григорьев Д. Н. Влияние ионов металлов на структуру ДНК в условиях различных внешних воздействий. На правах рукописи. Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.25 - биофизика. Харьковский государственный университет, г. Харьков, 1997.

Методами калориметрии и вискозиметрии изучено влияние ионов Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} на структуру ДНК в условиях различных внешних воздействий таких как ионизирующее излучение и изменение состава растворителя. Показано, что теория равновесного связывания совместно с теорией «скрепок» адекватно описывают установленные экспериментальные зависимости температуры плавления ДНК от концентрации ионов двухвалентных металлов (Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}) как в условиях разбавленных так и концентрированных растворов ДНК. Константы связывания ионов Mn^{2+} , Ca^{2+} и Cu^{2+} с ДНК в большей степени зависят от ионной силы раствора, чем от концентрации биополимера. Предложена модель плавления «основных» и агрегационных связей комплексов ДНК-металл.

Установлены зависимости характеристической вязкости ДНК $[\eta]$ и параметра исключенного объема от концентраций веществ связывающих воду (1,2-пропандиола, ДМСО, глицерина) при различных значениях ионных сил раствора. Показано, что в этих условиях изменения макромолекулярных параметров ДНК определяются объемными внутримолекулярными взаимодействиями и не сопровождаются существенной денатурацией ДНК.

Показано, что ДНК выделенная из тканей животных подвергавшихся действию радиации в условиях

Чернобыльской зоны, характеризуется существенным содержанием значительного количества металлов (Zn, Se, Cu, Fe и др.), низкомолекулярной фракции, одно- и двунитевых дефектов. Результаты вискозиметрических измерений ДНК животных, подвергнутых совместному действию ионов двухвалентных металлов (Cu^{2+} , Zn^{2+}) и ионизирующего излучения в условиях Чернобыльской зоны свидетельствуют о нарастании числа одонитевых дефектов биополимера с увеличением времени действия металлов. Этот эффект обусловлен связыванием металла с азотистыми основаниями ДНК, дестабилизацией ее структуры, что усиливает действие радиации. При этом эффект меди оказывается сильнее эффекта цинка.

SUMMARY

Grigoriev D.N. Metal ion influence on DNA structure under different external effects. In the capacity of manuscript. DISSERTATION for competition for a Candidate degree in Physics and Mathematics in 01.04.25 Speciality - Biophysics. Kharkov State University, Kharkov, 1997.

Using calorimetry and viscometry, the influence of Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ions on the DNA structure has been studied at different external effects such as ionizing irradiation and changes in the solvent content. It has been shown that, together with the «ligand» theory, the equilibrium binding theory describes identically the determined experimental dependences of the DNA melting temperature on the concentration of divalent metal ions (Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}) in soluted and concentrated DNA solutions. Association constants for Mn^{2+} , Ca^{2+} and Cu^{2+} ions bound to DNA depend more on the solution ionic strength than on the biopolymer concentration. A model has been proposed for describing «basic» and aggregation bonds in DNA-metal complexes.

Dependences of the DNA intrinsic viscosity and the excluded volume parameter on the concentrations of substances binding water (1,2-propanediol, DMSO, glycerol) have been determined at different values of the solution ionic strength. It was shown that under these conditions changes in DNA macromolecular parameters were conditioned with volume intramolecular interactions and were not followed with the essential DNA denaturation.

It was shown that DNA extracted from tissues of animals exposed to irradiation in the Chernobyl zone is characterized with the significant content of metals (Zn, Se, Cu, Fe and so on) , with the low molecular structure and single- and double-chain defects. Viscometric results for DNA from animals exposed to the combined action of divalent metal ions (Cu^{2+} , Zn^{2+}) ions and ionizing irradiation in the Chernobyl zone evidence the increase of the metal action term. This effect is due to the metal ion binding to DNA nitrogen bases, destabilization of the DNA structure, strengthening the radiation action. At the same time copper ions have a stronger influence than zinc ones.

КЛЮЧОВІ СЛОВА

ДНК, іони металів, модель рівноважного зв'язування, константи зв'язування, іонізуюче випромінення, змішані розчинники.

438/68

Ав 37.957

Подписано к печати 13.05.1997
Физ. п. л. I, I. Уч.- изд. п. л. I, I
Тираж 100. Зак. I3-97. Бесплатно.

Ротапринт Физико-тех. Института низ. темп.,
Харьков - №164, пр. Ленина, 47