

Вплив рентгенівського опромінювання на структуру молекул дезоксирибонуклеїнової кислоти в розчинах

В. А. Жидков, Г. М. Рекун

Лабораторія біофізики Інституту фізіології
ім. О. О. Богомольця Академії наук УРСР, Київ

Серед різноманітних біохімічних структур та функцій, що зазнають змін під впливом радіації, особливу увагу дослідників привертають нуклеїнові кислоти, роль яких в життєдіяльності організму надзвичайно висока. Нуклеопротейди та обмінні процеси, в яких вони беруть участь, пов'язані з такими властивостями живого, як ріст, регенерація, диференціація клітин в процесі індивідуального розвитку, синтез специфічних білків, передача спадковості тощо.

В галузі вивчення основ біологічної дії радіації зібраний значний експериментальний матеріал і зроблені теоретичні узагальнення. Проте, численні праці по вивченню механізмів дії іонізуючих випромінювань на тваринний організм і досі ще не вилились у струнку систему, яка змогла б з'ясувати весь комплекс змін, що спостерігаються в експерименті і клініці. Незважаючи на те, що експериментальні дані випереджають розвиток теорії, необхідною умовою вирішення вказаної проблеми є розширення експериментальних досліджень. Метою нашої роботи є вивчення одного з надзвичайно складних питань механізму дії радіації на обмін нуклеопротейдів — молекулярну структуру дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК).

Численні дослідження, проведені в цьому напрямку, виявили високу чутливість до впливу іонізуючого проміння нуклеопротейдів [4, 9, 10, 12, 16], а також нуклеїнових кислот [1, 2, 3, 8, 13, 17]. Зокрема, було встановлено, що під впливом іонізуючих випромінювань розчини ДНК значно змінюють в'язкість в зв'язку з порушенням форми молекул. Вказані зміни можна пояснити розривами складної двоспіральної структури ДНК, в основному, водневих зв'язків та вуглеводно-фосфорного ланцюга. Відбувається розкривання кілець азотистих основ зі збільшенням аміних груп.

Для вивчення впливу іонізуючої радіації на молекулярну структуру ДНК ми визначали різницю у впливі радіації на розчини виділеної з різних видів тварин ДНК; залежність впливу різних доз рентгенівського проміння від концентрації розчинів ДНК; застосовували методи хроматографії, абсорбційного аналізу і вимірювання тиску водної пари над розчинами, виявляли деякі деталі змін структури біополімера.

Методика досліджень

Дезоксирибонуклеїнову кислоту виділяли з вилочкової залози теляти, еритроцитів качиної крові та з слизової оболонки кишок кроля.

Для вивчення в'язкості розчинів ДНК ми користувалися горизонтальним віскозиметром, в основу якого покладена конструкція Оствальда і Мольса. Доцільність

застосування віскозиметра такого типу зумовлена можливістю швидкого проведення серії дослідів при постійному тиску і стабільних температурних умовах. Розміри капіляра: довжина 150 мм, діаметр 1 мм, об'єм розчину 4,0 см³. Дослідження в'язкості водних розчинів ДНК провадили при температурі $36 \pm 0,1^\circ \text{C}$.

Наші спостереження показали, що опромінення розчинів ДНК впливає не тільки на їх в'язкість, а також і на деякі інші фізико-хімічні властивості.

При випаровуванні розчинів ДНК ми встановили, що опромінений розчин завжди випаровувався швидше контрольного. В зв'язку з цим ми вирішили вивчити зміни тиску насиченої пари води над розчинами ДНК, що, на нашу думку, може дати відомості про термодинамічні властивості досліджуваних розчинів. Найбільш доцільним для наших умов виявився метод вимірювання тиску насиченої пари. Вимірювання провадили статичним методом [6], невеликі різниці тисків визначали диференціальним манометром. Досліди проведені при температурі $50 \pm 0,1^\circ \text{C}$. Дослідним шляхом встановлено, що стабільні результати можна одержати після 30–45-хвилинного термостатування розчинів ДНК.

Хроматографію азотистих основ провадили на хроматографічному папері Ленінградської фабрики № 2. Пробі спалювали перхлористою кислотою. Розділення азотистих основ провадили в спеціальному посуді (при 37°C) сумішшю бутилового, етилового спиртів та соляної кислоти. Після висушування хроматограми розглядали в ультрафіолетовому промінні (світлофільтр УФ-1). Замірюючи R_f , азотисті основи елювали 0,1 та 1 н. розчинами соляної кислоти.

Спектрофотометрію азотистих основ та розчинів ДНК провадили на кварцевому спектрофотометрі СФ-4 за стандартною методикою [5] з урахуванням поправок на власне поглинання кювет.

Умови опромінення розчинів: апарат РУМ-11 при напрузі 180 кВ, силі струму 10 ма, відстань від розчинів — 30 см, без фільтрів, потужність дози 192 р/хв.

Результати досліджень

Метою першої серії дослідів було вивчення специфічності впливу рентгенівського проміння на розчин ДНК залежно від дози опромінення, концентрації розчину та видової властивості цього біополімера.

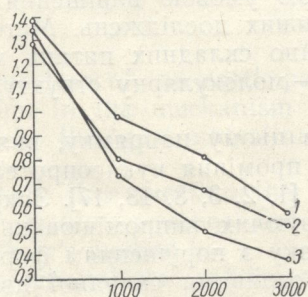


Рис. 1. Зміни питомої в'язкості 0,015%-них розчинів ДНК різних видів тварин — качки (1), теляти (2) і кролика (3) — під впливом рентгенівського опромінювання.

По вертикалі — питома в'язкість η/η_0 — 1, по горизонталі — доза в рентгенах.

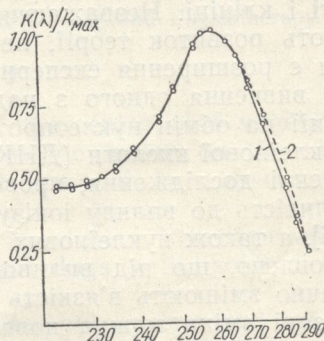


Рис. 2. Зміни форми абсорбційного спектра розчину ДНК під впливом рентгенівського опромінювання:

1 — неопромінений розчин; 2 — розчин, опромінений дозою 3000 р. По вертикалі — відносний коефіцієнт поглинання, по горизонталі — довжина хвилі в ммк.

Для цього ми опромінювали водні розчини різновидової ДНК в концентраціях від 0,005 до 0,3% рентгенівським промінням в дозах 600, 1000, 1500 та 3000 р.

Результати дослідів зведені в табл. 1 та зображені на рис. 1.

Як видно з наведеної таблиці, вже починаючи з доз 600 р відбувається статистично достовірне зниження питомої в'язкості досліджу-

Доза опромінення,

600
1000
1500
3000

600
1000
1500
3000

1000
1500
3000

ваних розчинів
ності від дози
центрації розч
змін питомої в
ного напрямку.
розчинах пташ
20% щодо ков
ДНК нам вдало
Збільшення пит
біополімера, по
никненням міжм

Отже, чутли
розчини малих к
те, що в сильно
ну «великих роз
провадити з кон

Слід відзнач
що була виділен
типною методико
ких відмінностей.

На цьому фо
кість різновидов
загальній спрямо
в'язкості ступінь
(див. рис. 1).

Аналіз навед
виявилась більш

Таблиця 1

Питома в'язкість розчинів ДНК різної концентрації в нормі
та під впливом рентгенівського проміння

Доза опромінення, в р	Концентрація (в %)								
	0,005	0,01	0,015	0,02	0,025	0,04	0,1	0,2	0,3
Пташина ДНК									
—	0,46	0,97	1,37	2,02	2,63	4,24	5,03	6,79	—
600	0,18	—	0,95	—	2,16	—	—	—	—
1000	0,14	—	0,97	—	1,86	—	—	—	—
1500	0,15	—	0,82	—	1,57	2,88	5,79	8,13	—
3000	0,07	0,26	0,58	1,14	1,55	—	—	—	—
Теляча ДНК									
—	0,40	0,97	1,27	2,03	2,60	5,12	6,21	13,0	15,6
600	0,12	0,42	0,81	1,17	2,38	—	—	—	—
1000	0,11	—	0,79	—	2,15	—	—	—	—
1500	0,09	0,36	0,67	0,80	2,13	2,38	4,44	11,0	21,0
3000	—	0,25	0,58	0,75	0,72	—	—	—	—
Кроляча ДНК									
—	—	—	1,36	—	—	—	—	—	—
1000	—	—	0,74	—	—	—	—	—	—
1500	—	—	0,51	—	—	—	—	—	—
3000	—	—	0,36	—	—	—	—	—	—

ваних розчинів ДНК. Відзначені зміни перебувають у прямій залежності від дози опромінення і до певного ступеня не залежать від концентрації розчинів. Проте, починаючи з концентрації 0,1% характер змін питомої в'язкості опромінених розчинів ДНК набуває протилежного напрямку. Особливо чітко і найбільш рано це явище помітно на розчинах пташиної ДНК, питома в'язкість яких підвищується на 15—20% щодо контрольних проб. Аналогічні зміни в розчинах телячої ДНК нам вдалося спостерігати лише починаючи з концентрацій 0,3%. Збільшення питомої в'язкості опромінених розчинів досліджуваного біополімера, по аналогії з синтетичними полімерами, слід пояснити виникненням міжмолекулярних зшивок.

Отже, чутливими до впливу рентгенівського проміння виявились розчини малих концентрацій (в межах 0,005—0,025%). Але зважаючи на те, що в сильно розведених розчинах не виключена можливість дії закону «великих розведень», ми визнали за доцільне далі дослідження провадити з концентраціями 0,015%.

Слід відзначити, що питома в'язкість контрольних розчинів ДНК, що була виділена з тканин різних видів тварин, навіть не зовсім однотипною методикою, при однаковій концентрації практично не має чітких відмінностей.

На цьому фоні значний інтерес становлять дані про питому в'язкість різновидової ДНК в умовах рентгенівського опромінення. При загальній спрямованості (концентрація до 0,1%) до зниження питомої в'язкості ступінь цього зниження для різних видів тварин — різна (див. рис. 1).

Аналіз наведеного матеріалу свідчить про те, що пташина ДНК виявилась більш стійкою до впливу рентгенівського проміння, ніж те-

ляча і кроляча. Різниця досягає 10—20% і мало залежить від величини доз. Цікаво, що вказана закономірність зберігається і при таких дозах, при яких питома в'язкість падає дуже сильно, що свідчить про глибокі зміни структури досліджуваного субстрату (3000—6000 р).

Співвідношення тисків пари над розчином P_1 і чистим розчинником P_0 при сталій температурі визначає зміну парціальної молярної вільної енергії ΔF відповідно до термодинамічного рівняння

$$\Delta F = RT \ln \frac{P_1}{P_0},$$

де R — газова стала. Застосуємо наведене рівняння для порівняння тисків пари над розчинами ДНК, один з яких був опромінений (тиск P_R). Інший — неопромінений (тиск P_N):

$$f = \Delta F_R - \Delta F_N = \frac{RT}{P_0} (P_R - P_N).$$

Отже, вимірювання різниці тисків пари над розчинами ДНК дає можливість визначити зміну вільної енергії розчину після впливу рентгєнівського проміння.

Таблиця 2
Результати дослідження змін тиску пари над розчинами ДНК (0,18%) після опромінєння

Доза, в р	Теляча ДНК		Качина ДНК	
	$P_R - P_N$, г/см ²	f , кал/моль	$P_R - P_N$, г/см ²	f , кал/моль
3000	$0,34 \pm 0,08$	1,7	$0,68 \pm 0,17$	3,5
1000	$0,17 \pm 0,08$	0,87	$0,26 \pm 0,08$	1,1

Проведені досліди показали, що описана методика дослідження дозволяє встановити зміни вільної енергії розчинів ДНК при рентгєнівському опромінюванні, починаючи з дози 1000 р. Збільшення тиску пари над розчинами, що опромінювались, свідчить, на нашу думку, про перевагу, в даних умовах проведення досліду, процесів зшивання полімера над процесами деструкції.

Дослідження на спектрографі ИСП-28 спектрів поглинання розчинів ДНК, виділеної з теляти, показали, що під впливом дози 3000 р поглинання в максимумі (260 мк) збільшується на 2—3%. Подібний ефект при більших дозах відзначається також і іншими авторами [15]. На відміну від наведеного дослідження, де автор спостерігав лише паралельне зміщення спектра поглинання, в наших дослідах змінювався також характер абсорбційної кривої. На рис. 2 порівнюються спектри поглинання обох розчинів; за одиницю прийнято поглинання в максимумі. Відносне поглинання світла розчином, що опромінювався, помітно більше в ділянці 280 мк.

При спектрофотометричному дослідженні азотистих основ спектри поглинання вимірювали відносно елюата, що одержували за тих самих умов з ділянки паперу, на який розчин не наносили.

Типові спектри поглинання азотистих основ ДНК, виділені з теляти, наведені на рис. 3. Хід абсорбційних кривих збігається з літера-

турними даними кривих аденіну рівняння спектра в ділянці

Рис. 3.
з неоп
По вер

результати одержані при поглинанні тиміну (в максимумі при 267 мк). Це відповідає літературі [14].

Одним з центрів спинитись, є специфічність різновидової ДНК. Різновидовими факторами загальновідомими факторами на в'язкість ДНК, виділеної з теляти, є питома в'язкість (тільки 20%), але вона достовірна в дозах опромінєння різновидової ДНК. Особливий інтерес представляє рентгєнівський промінь. Аналіз експериментальних даних по в'язкості

турними даними [7]. В наших умовах не виявлені зміни абсорбційних кривих аденіну (а) та цитозину (г), виділених з опроміненої ДНК. Порівняння спектрів поглинання гуаніну (б) показує, що хід кривої поглинання в ділянці 270 мкм для обох розчинів різний. Нарешті, найчіткіші

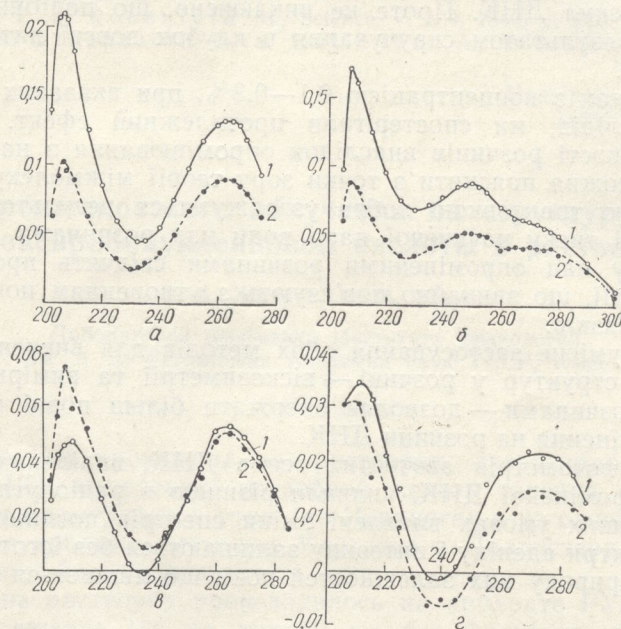


Рис. 3. Спектри поглинання азотистих основ, виділених з неопромінених (1) і опромінених (2) розчинів ДНК:

а — аденін; б — гуанін; в — тимін; г — цитозин.
По вертикалі — зміни оптичної густини, по горизонталі — довжина хвилі в мкм.

результати одержані при вивченні впливу опромінювання на спектр поглинання тиміну (в). Видно, що мінімум при 231 мкм зменшується щодо максимуму при 267 мкм для препарату, виділеного з опроміненої ДНК. Це відповідає літературним даним про найбільшу радіочутливість тиміну [14].

Обговорення результатів досліджень

Одним з центральних питань, на яких ми вважаємо необхідним спинитись, є специфічність у впливі рентгенівського опромінювання на різновидову ДНК. Результати дослідів свідчать про те, що поряд із загальновідомими фактами [1, 2, 3, 8, 13, 17] про вплив рентгенівського проміння на в'язкість розчинів ДНК, реакція цього біосубстрата не однакова для ДНК, виділеної з різних видів тварин. Різниця в зменшенні питомої в'язкості трьох досліджуваних видів не дуже велика (від 7 до 20%), але вона достовірна і досить чітко виражена при всіх досліджених нами дозах опромінення. Водночас питома в'язкість неопромінених розчинів різновидової ДНК відрізняється значно менше.

Особливий інтерес становлять дані, одержані при вивченні впливу рентгенівського проміння на водні розчини ДНК різної концентрації. Аналіз експериментального матеріалу свідчить про чітко виражене зниження питомої в'язкості водних розчинів ДНК малих концентрацій

при всіх застосованих нами дозах, і незмінність або підвищення цього показника при концентраціях більших ніж 0,1%.

Зниження питомої в'язкості розчинів ДНК в концентраціях 0,01—0,025%, на нашу думку, слід пояснити як результат деструкції опромінених молекул ДНК. Проте не виключено, що подібний ефект [11] може бути результатом скручування в клубок довгої нитковидної молекули ДНК.

В розчинах з концентрацією 0,1—0,3%, при вказаних умовах проведення дослідів, ми спостерігали протилежний ефект. Підвищення питомої в'язкості розчинів внаслідок опромінювання з найбільшою вірогідністю можна пояснити з точки зору теорії міжмолекулярних зшивок. З такою трактовкою добре узгоджуються результати, одержані при вивченні тиску насиченої пари води над розчинами ДНК. Підвищення тиску над опроміненими розчинами свідчить про збільшення вільної енергії, що звичайно пов'язують з утворенням нових міжмолекулярних зв'язків.

Отже, сумісне застосування обох методів для вивчення стану молекулярних структур у розчині — віскозиметрії та вимірювання тиску пари над розчинами — дозволяє одержати більш повні відомості про вплив опромінення на розчини ДНК.

Спектрофотометрія азотистих основ ДНК, виділених з опроміненої та неопроміненої ДНК, виявили різницю в радіочутливості різних основ. В наших умовах виявлені зміни спектрів поглинання тиміну і гуаніну, спектри аденіну і цитозину залишаються без істотних змін. Питання про природу цих залежностей поки що лишається нез'ясованим.

Висновки

1. Під впливом рентгенівського проміння відбувається зниження питомої в'язкості водних розчинів ДНК в концентрації 0,005—0,04%. В розчинах з концентрацією понад 0,1% питомої в'язкості та тиск насиченої пари над опроміненими розчинами збільшуються, що свідчить про переважання в цих умовах процесів міжмолекулярних зшивок.

2. ДНК різних видів тварин (теля, кролик, качка) виявляє чітку специфічність до впливу рентгенівського проміння, причому більшою резистентністю характеризується ДНК качок.

3. Спектрофотометричні дослідження показали більшу чутливість до опромінення тиміну і гуаніну.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бак З., Александер П., Основы радиобиологии, ИЛ, М., 1963.
2. Кузин А. М., Стручков В. А. и Стражевская Н. Б., ДАН СССР, т. 130, 1960, с. 895.
3. Ларионов А. Ф., Манойлов С. Е., Раскина С. И. и Сорокина Е. А., Вестник рентгенологии и радиологии, в. 3, 1953.
4. Пасынский А. Г., Волкова М. С. и Павловская Т. Е., ДАН СССР, т. 101, 1955, с. 723.
5. Пешкова В. М. и Громова М. И., Практическое руководство по спектрофотометрии и колориметрии, МГУ, М., 1961.
6. Хала Э., Пик И., Фрид В. и Вилим О., Равновесие между жидкостью и паром, ИЛ, М., 1962.
7. Чаргафф Э. и Давидсон Д., Нуклеиновые кислоты, химия и биология, ИЛ, М., 1957.
8. Чепинога О. П., в сб. «Действие ионизирующих излучений на животный организм», Киев, Медиздат, 1960, с. 46.
9. Berstein M., Nature, v. 104, 1954, p. 463.
10. Butler G., Canada J. Res., v. 27, 1949, p. 972.

11. Doty P.,
12. Fisher V.
13. Hevesi
14. Sholes C.
15. Sholes G.
- Level, Vienn
16. Sparrou
17. Taylor B

p. 19.

Влияние р дезо

Исследован
кислоты (ДНК
и Гордону), из
ки кишечника в
депротенизации

Облучение
ловиях: напряж
трубки 30 см, мо

Изучались с
ров ДНК: вязкос
ления насыщения

Установлено
из теленка ДНК

концентрированн
Удельная вязкос
видов животных, у

Обнаружено,
ными растворами

рение таких раств
ношения давлений

оценить изменение
тате облучения, 1

1,7 кал/мол.
Спектрофотоме

рентгеновского обл
области 280 мкм (1

чивается.
Хроматография

наружили (при ука
глощения аденина и

ленного из облученн
жению минимума п

267 мкм. Ход кривой
нии раствора изменяе

7—Фізіологічний журнал № 5.

11. Doty P., J. Cellular a. Compar. Physiol., v. 49, 1957, p. 27.
12. Fisher W., Anderson N. a. Wilburg K., Exptl. Cell. Res., v. 18, 1959, p. 100.
13. Hevesi G., Nature, v. 163, 1948, p. 869.
14. Sholes G. a. Weiss J., J. Molec. Biol., v. 2, 1960, p. 379.
15. Sholes G. a. Weiss J., Biological Effects of Ionizing Radiation on the Molecular Level, Vienna, 1962, p. 127.
16. Sparrow T. a. Rosenfeld M., Science, v. 104, 1946, p. 245.
17. Taylor B., Greenstein G. a. Hollender A., Arch. Biochem., v. 16, 1948, p. 19.

Надійшла до редакції
19.III 1964 р.

Влияние рентгеновского облучения на структуру молекул дезоксирибонуклеиновой кислоты в растворах

В. А. Жидков, Г. М. Рекун

Лаборатория биофизики Института физиологии
им. А. А. Богомольца Академии наук УССР, Киев

Резюме

Исследования проведены на растворах дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), выделенной из зубной железы теленка (по Гулланду и Гордону), из эритроцитов утки (по Чепиноге) и из слизистой оболочки кишечника кролика (методом Мирского и Поллистера с фенольной депротеинизацией по Георгиеву).

Облучение растворов производилось на аппарате РУМ-11 при условиях: напряжение 180 кВ, ток 10 мА, без фильтров, расстояние от трубки 30 см, мощность дозы 192 р/мин.

Изучались следующие структурно-механические свойства растворов ДНК: вязкость (на горизонтальном вискозиметре) и изменения давления насыщенных водяных паров над растворами (определено статическим методом при 50°С).

Установлено увеличение вязкости 0,3%-ных растворов выделенной из теленка ДНК под влиянием облучения дозой 1500 р; вязкость менее концентрированных растворов уменьшается начиная с доз от 600 р. Удельная вязкость 0,015%-ных растворов ДНК, выделенной из разных видов животных, уменьшается зависимо от дозы и вида ДНК.

Обнаружено, что давление насыщенных паров воды над облученными растворами ДНК увеличивается, что вызывает усиленное испарение таких растворов при повышении температуры. Измерения соотношения давлений паров над 0,18%-ными растворами ДНК позволило оценить изменение парциальной молярной свободной энергии в результате облучения, которое для дозы 3000 р составляет примерно 1,7 кал/мол.

Спектрофотометрия растворов ДНК показала, что под влиянием рентгеновского облучения дозой 3000 р относительное поглощение в области 280 мкм (по отношению к поглощению в максимуме) увеличивается.

Хроматография и спектрофотометрия азотистых оснований не обнаружили (при указанных условиях опыта) изменений в кривых поглощения аденина и цитозина. В спектре поглощения тимина, выделенного из облученных растворов ДНК, наблюдается тенденция к снижению минимума при 231 мкм по сравнению с максимумом при 267 мкм. Ход кривой поглощения гуанина в области 270 мкм при облучении раствора изменяется.

Результаты проведенной работы показывают, что под действием рентгеновского облучения даже при дозах 1000—3000 *p* наблюдаются значительные изменения свойств ДНК, выделенной из разных видов и тканей животных.

Effect of X-ray Irradiation on the Structure of DNA Molecules in Solutions

V. A. Zhidkov and G. M. Rekun

Laboratory of biophysics of the A. A. Bogomoletz Institute of Physiology
of the Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

The investigations were conducted on solutions of DNA isolated from the thyroid of a calf, from duck erythrocytes, from the mucosa of the rabbit intestine.

The following structural-mechanical properties of irradiated DNA solutions were studied: viscosity and change in pressure of saturated water vapour over the solutions at 50°C. A decrease in the specific viscosity of DNA solutions in concentrations of 0.01—0.025 p. c. under the effect of doses of 600 r and over was established, which is explained as a result of destruction of DNA molecules; solutions of concentration of 0.1—0.3 p. c. irradiation lead to an increase in viscosity. The pressure of saturated water vapour over 0.18 p. c. solutions rises as a result of irradiation, which indicates increase in the free energy. The results are explained by the author by the formation under the effect of irradiation (in concentrated DNA solutions) of intermolecular bonds. The change in viscosity of DNA solutions from various species of animals displays specific features to the action of X-ray irradiation.

The spectrophotometric investigations of nitrogenous bases showed that thymine and guanine are most sensitive to radiation at doses of 3000 r.

В літерату
ринному орган
співробітник В.
баках, морські
зонтальному ко
0,5° С або підви
у каудо-краніал
ратури тіла тва
прискорень вив
лейко (1958, 19
І. І. Потоцька (1
ченко (1963) та
ректальної темпе
ного впливу при
чили зниження і
разу ж після при
через півгодини п
В. І. Даниле
ректальної темпе
вбитих після впл
(10 тварин) вим
під час прискор
на 3—8° С.

Зниження тем
ження процесів
ними М. І. Путілі
Отже встановл
діальних прискорен

Температуру ті
гого та третього
Р. М. Баєвський, Д
мірювання темпера
дослідженнях Хелві
(1959) і Міллера (19

Ми вивчали тем
тіла білих щурів бе
скорень від 10 до 40
скоренні в 10 і 20 g
скореннях від 3,6 до