

Дослідження профілактичних властивостей ДНК та продуктів її гідролізу на клітинній моделі променевих уражень, викликаних швидкими нейтронами

Є. Ю. Чеботарьов, Е. З. Рябова, В. М. Індик

*Відділ радіаційного захисту Інституту фізіології
ім. О. О. Богомольця АН УРСР, Київ*

Різні структури клітин мають неоднакову радіочутливість. Найчутливішими є нуклеїнові кислоти. Ураження нуклеїнового обміну призводить до порушення процесів клітинного поділу та до загибелі клітини [6, 7, 9, 13, 14].

Тому і захист має плануватися з урахуванням запобігання денатурації нуклеїнових кислот.

На думку Бака і Александера [14], одним із методів захисту може бути екранування найчутливіших ділянок молекул ферментів з допомогою введення в організм високомолекулярних речовин. Введення ДНК в організм до опромінення може сприяти зменшенню радіобіологічного ефекту.

Ряд дослідників [17] відзначає, що ДНК, введена як до опромінення, так і після нього, сприяє збільшенню виживання тварин, опромінених рентгенівським промінням.

Більш чіткий захисний ефект було одержано при введенні гідролізної ДНК.

Завданням нашого дослідження було вивчення захисного впливу ДНК і продуктів її гідролізу на клітинній моделі променевого ураження.

Найбільш зручною моделлю є клітини дріжджових культур [3, 12]. Як і інші біологічні об'єкти, дріжджові клітини підлягають усім законам живих матерій. Великий розмір клітини дозволяє вивчати зміни окремих компонентів клітини на різних стадіях росту.

Завдяки порівняльній однорідності матеріалу та можливості точного відтворення культивування досліджуваних об'єктів, можна домогтися повного усунення впливу інших факторів, здатних затемнити або спотворити вплив досліджуваних речовин.

Методика досліджень

На дріжджових клітинах *Saccharomyces vini* штам Merpi-139-B вивчали профілактичні властивості мікробної ДНК (*Pseudomonas Fluorescens*) з концентрацією 1250 γ в 1 мл, молекулярною вагою 13 000 000, що містить близько 1% білка. ДНК зберігали в цитратному буфері при температурі $+3 - +4^{\circ}\text{C}$ [2].

Тридобову дріжджову культуру, вирощену при температурі 30°C на твердому живильному середовищі сусло-агар, синтезували в розчинах ДНК з концентрацією $1,8 \cdot 10^{-7}$ і $1,1 \cdot 10^{-7}$ γ на одну клітину.

Такі концентрації були підібрані, виходячи з обчислення вмісту ДНК у клітині (10^{-3} — 10^{-5} γ) та здатності останньої поглинати ДНК в два—чотири рази більше, ніж міститься у ній [1, 15, 16].

Для контролю дріжджову культуру суспензували в стерильному фізіологічному розчині. Концентрація клітин у розчинах відповідала 2 млн/мл.

Виготовлені таким способом розчини опромінювали швидкими нейтронами в горизонтальному каналі атомного реактора ВВР-М за таких умов: теплова потужність реактора 10 Мев, потужність дози 10—11 рад/хв. Сумарна доза — 10 000 рад — LD — 50. Домішок γ -фону не перевищував 10%.

Про характер захисного впливу досліджуваних речовин судили на підставі даних про виживання і зростання висіяних колоній, вторинну люмінесценцію клітин, забарвлення акридиновим оранжевим.

Паралельно з опроміненими клітинами на живильне середовище для контролю висівали дріжджові культури, інкубовані на стерильному фізіологічному розчині, а також на досліджуваному розчині ДНК, але не опромінені.

Результати досліджень

Як показали наші дослідження, ДНК-нативна, в концентрації $1,8 \cdot 10^{-7}$ γ на одну клітину не спричиняє захисного впливу при опроміненні швидкими нейтронами.

Виживання дріжджової культури, опроміненої в розчині ДНК, менше, ніж при опроміненні у воді. Так, наприклад, на третю добу з контрольних культур виростає 471 колонія, а з культури, опроміненої в розчині ДНК, — 431, коефіцієнт захисту становить 0,9.

Інкубація неопромінених дріжджових культур у розчині ДНК наведеної концентрації приводить до пригнічення росту на 20—25% порівняно з клітинами, інкубованими на фізіологічному розчині.

Зменшення інкубації ДНК в розчині до $1,1 \cdot 10^{-7}$ γ на клітину приводить до стимуляції росту неопромінених культур. У цьому випадку відзначалось збільшення росту колоній на 10—12%.

Добре проявляється захисний ефект при опроміненні дріжджових клітин у розчині з даною концентрацією ДНК.

При цьому абсолютна величина коефіцієнта захисту [5] підвищується до 3.

Якщо дріжджові культури опромінювати в розчині ДНК, що зазнала температурного гідролізу, то при концентрації $1,8 \cdot 10^{-7}$ γ на клітину можна спостерігати добре виражений захисний вплив. Абсолютна величина захисного коефіцієнта підвищується до 5 (див. таблицю).

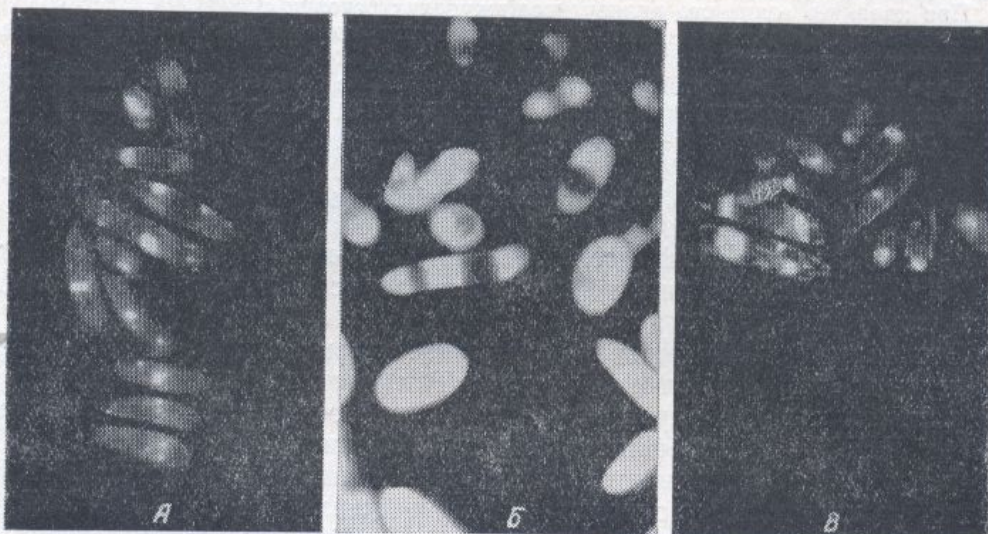
Брунькування та загибель дріжджових клітин у різні строки після опромінення швидкими нейтронами в процентах (б — клітини, що брунькуються; м — мертві клітини)

Середовище	Час після опромінення (години)					
	2		4		6	
	б	м	б	м	б	м
Фізіологічний розчин (контроль)	4,7	3,7	5,3	3,3	5,0	3,8
Фізіологічний розчин (опромінений)	1,8	15,7	3,1	27	3,1	30
ДНК-нативна (контроль)	5,0	0,7	5,3	0,5	5,2	0,7
ДНК-нативна (опромінена)	3,3	5,7	3,9	7,7	4	7,2
ДНК-гідролізна (контроль)	5,7	0,4	5,7	0,4	6	0,4
ДНК-гідролізна (опромінена)	4	3,4	4,2	4,4	4,6	4,5

При мікроскопічному дослідженні дріжджових культур відзначається збільшення поліморфізму клітин, опромінених швидкими нейтронами. Як правило, опромінені клітини збільшуються в об'ємі, набувають округлої форми. Зміна форми та збільшення опромінених клітин

можна пояснити пригніченням процесів поділу. Проте ріст клітини триває, і тому, замість збільшення їх кількості, збільшується розмір [18].

При підрахуванні клітин, що брунькуються, та мертвих клітин дріжджових культур у різні строки після опромінення було відзначено збільшення клітин, що брунькуються, інкубованих у розчині нативної ДНК з концентрацією $1,1 \cdot 10^{-7}$ на клітину та зменшення мертвих, порівняно з культурою, опроміненою у воді.



Інтенсивність люмінесценції клітин до опромінення (А), після опромінення в фізіологічному розчині (Б) та в розчині ДНК (В).

Опромінення дріжджів у розчині гідролізованої ДНК приводить до ще більшого виникнення клітин, що брунькуються, та зменшення кількості мертвих клітин.

При вивченні вторинної люмінесценції дріжджових клітин, забарвлених акридиновим оранжевим, було відзначено чітке збільшення інтенсивності свічення всіх опромінених культур. У більшості клітин, опромінених у фізіологічному розчині, з'являються ділянки оранжевого свічення в цитоплазмі.

Інтенсивність люмінесценції клітин, опромінених у розчинах гідролізованої ДНК з концентрацією $1,1 \cdot 10^{-7}$ на клітину, була менш яскравою; ядро звичайно мало слабо-жовте свічення. Рідко траплялись клітини з оранжевим свіченням цитоплазми.

Обговорення результатів досліджень

Проведені дослідження захисного впливу ДНК та продуктів температурного гідролізу її на клітинному рівні дозволяють відзначити захисні властивості досліджуваних речовин. Особливо добрий захисний ефект дають гідролізати ДНК.

Як видно з проведених експериментів, ДНК-нативна запобігає променевому ураженню клітинної ДНК. Про це свідчить як збереження здатності клітинного поділу після опромінення, так і характер люмінесценції опромінених клітин.

Як відомо, збільшення інтенсивності вторинної люмінесценції клітинних ядер при радіаційному ураженні зумовлено різними фізико-хімічними порушеннями комплексу ДНК-протеїду, з підвищенням його лабільності та відщепленням ДНК від білка [4, 5].

Тому більш слабе свічення дріжджових клітин, опромінених у розчинах нативної та гідролізованої ДНК, свідчить про менше променеве ураження.

Яскраву люмінесценцію опромінених контрольних клітин можна пояснити, видимо, порушенням надмолекулярних структур ДНК і ослабленням їх екрануючого впливу, що приводить до збільшення сорбційної поверхні молекул ДНК. В результаті кількість зв'язаного барвника збільшується і посилюється флюоресценція. Поява оранжевого свічення ядра вказує на денатураційні зміни молекули ДНК, на яку акридиновий оранжевий адсорбується у вигляді димерів [8].

У клітинах, опромінених у розчинах ДНК, такі зміни трапляються значно рідкіше.

Особливо добрий захисний вплив у продуктів температурного гідролізу ДНК. Пояснення цього явища, очевидно, можна шукати в тому, що денатуровані структури ДНК набагато чутливіші до впливу різних фізичних і хімічних факторів, ніж нативні дволанцюгові [10, 11].

У відкритих ділянках частково денатурованої ДНК різко підвищується здатність азотистих основ. В результаті посилюються її «затравочні» властивості.

Отже, можна припустити, що поява у клітині одноланцюгових полідезоксирибонуклеотидів, що мають високу «затравочну» активність, можуть стимулювати синтез ДНК, поділ і ріст клітин [18].

Ці припущення підтверджуються проведеними нами дослідженнями. Виживання дріжджових культур, опромінених у розчинах ДНК-гідролізату, значно збільшується щодо контролю. Інкубація неопромінених дріжджових клітин приводить до стимуляції росту колоній.

Одержані дані дають підставу зробити висновок, що ДНК та продукти її температурного гідролізу виявляють захисний вплив при опроміненні дріжджових клітин швидкими нейтронами.

Л і т е р а т у р а

1. Бреслер С. Е., Мосовицкий М. П., Тумковский А. Л.— ДАН СССР, 1963, 149, 3, 721.
2. Завильгельмский Г. Б. и др.— Биохимия, 1964, 29, 3.
3. Корогодін В. И.— Биофизика, 1958, III, 2.
4. Кондратьева Т. М., Пинто Р. И.— Цитология, 1961, 3, 106.
5. Кудряшов Ю. Б., Какушкина М. Л. и др.— Радиобиология, 1966, VI, 2.
6. Лебединский А. В., Москалев Ю. И.— В кн.: Вопросы биофизики и механизма действия ионизирующей радиации, под ред. чл.-корр. АН УССР проф. А. А. Городецкого. Изд-во «Здоровье», К., 1964.
7. Либинзон А. В., Цевелева И. А.— Радиобиология, 1966, VI, 1.
8. Мейсель М. А., Кондратьева Т. М.— Вопросы радиобиол., под ред. М. П. Побединского, П. Н. Киселева, Медгиз, Л., 1956, 314.
9. Корогодін В. И.— В кн.: Основы радиационной биол., под редакцией проф. А. М. Кузина, Н. И. Шапиро. Изд-во «Наука», 1964.
10. Салганик Р. И. и др.— ДАН СССР, 1962, 145, 2.
11. Салганик Р. И.— Биохимия, 1958, 23, 2.
12. Сокурова Е. Н.— Известия АН СССР, сер. биол. 1956, 6.
13. Токарская В. И., Кузин А. М.— Радиобиол., 1966, VI, 1.
14. Бак З., Александер К.— Основы радиобиол., М., ИЛ, 1963.
15. Scheffer— Acad. Press, N. Y., 5, 87.
16. Koch, Melching— Schriftenr. Bundesmin. wiss 1963, 25, 145.
17. Lea D. E.— Actions of Radiations on Living Cells. Cambridge University Press, 1955.
18. Okada E. R.— Arch. Biochem. and Biophys., 1955, 44, 95.

Надійшла до редакції
3.X 1966 р.

Испытание профилактических свойств ДНК и продуктов ее гидролиза на клеточной модели лучевых повреждений, вызванных быстрыми нейтронами

Е. Е. Чеботарев, Э. З. Рябова, В. М. Индык

Отдел радиационной защиты Института физиологии
им. А. А. Богомольца АН УССР, Киев

Резюме

В работе изучалось защитное действие ДНК и продуктов ее гидролиза на клеточной модели лучевого поражения. На дрожжевых клетках *Saccharom. vini*, штамм Мегри-139-В проведено изучение профилактических свойств нативной и гидролизной ДНК, облученных быстрыми нейтронами в дозе 10 000 рад — ЛД-50.

Нативная ДНК в дозе $1,8 \cdot 10^{-7}$ γ на одну клетку приводит к угнетению роста не облученных дрожжевых культур и не оказывает защитного действия при облучении быстрыми нейтронами. Уменьшение концентрации нативной ДНК в растворе до $1,1 \cdot 10^{-7}$ γ на клетку приводит к стимуляции роста необлученных культур и к выраженному защитному эффекту.

Наиболее выраженными защитными свойствами обладает гидролизная ДНК, которая в значительной степени повышает величину защитного коэффициента.

На основании своих исследований авторы делают заключение о наличии защитных свойств растворов нативной и гидролизной ДНК при облучении дрожжевых клеток быстрыми нейтронами.

Testing of the Prophylactic Properties of DNA and Its Hydrolysis Products on the Cell Model of Radiation Hazards, Evoked by Fast Neutrons

E. E. Chebotarev, E. Z. Ryabova, V. M. Indyk

Department of radiation protection of the A. A. Bogomoletz Institute of Physiology
of the Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev

Summary

A protective action of DNA and its hydrolysis products was tested on the cell model of radiation hazard. The prophylactic properties of the native and hydrolytic DNA were studied on the yeast cells of *Saccharom. vini*, strain megri-139-B, irradiated by fast neutrons in a dose of 10 000 rad — LD-50.

The native DNA in a dose of $1,8 \cdot 10^{-7}$ γ per a cell results in the inhibition of growth in the unirradiated yeast cultures and does not cause the protective action when irradiated by fast neutrons. The decrease of the concentration of the native DNA in the solution to $1,1 \cdot 10^{-7}$ γ per a cell causes the growth stimulation in the unirradiated cultures and pronounced protective effect.

Most pronounced protective properties have the hydrolytic DNA that increases the value of protective coefficient to a great extent.

On the basis of these investigations the authors draw a conclusion on the availability of the protective properties in the solutions of native and hydrolytic DNA at the irradiation of yeast cells by fast neutrons.