

Н. В. ЗАКАТОВА, В. А. ШАРПАТЫЙ

О МЕХАНИЗМЕ РАДИОЛИЗА ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ДНК

(Представлено академиком Н. М. Эмануэлем 30 III 1971)

Основными процессами радиолитического превращения ДНК в водных растворах, как известно, являются деполимеризация (разрушение сахарофосфатных фрагментов) и декодирование (поражение азотистых оснований). Цель работы состояла в том, чтобы выяснить, во-первых, могут ли быть эти процессы связаны между собой и, во-вторых, какие продукты радиоллиза воды их вызывают. За протеканием этих процессов следили по накоплению малондиальдегида * (МДА) — продукта превращения остатка 2-дезоксирибозы ⁽¹⁾, аммиака ⁽²⁾ и гидроперекисей (ГП) ^(3, 4) — продуктов превращения азотистых оснований.

Характеристики использовавшихся в работе препаратов (низкомолекулярного и высокомолекулярного) ДНК, методики приготовления растворов и их облучения описаны ранее ^(5, 6). В опытах снимались зависимости накопления продуктов радиоллиза от дозы (в интервале доз от 6 до 20 крад) в растворах ДНК разных концентраций. На рис. 1 и 2 приводятся концентрационные кривые $G(\text{МДА})$, $G(\text{NH}_3)$, $G(\text{ГП})$, и $G(\text{H}_2\text{O}_2)$ в координатах **, удобных для выявления первичных стадий радиоллиза ⁽⁷⁾. Концентрационные зависимости $G(\text{NH}_3)$ и $G(\text{МДА})$ с учетом переходного коэффициента удовлетворительно аппроксимируются к одной кривой (рис. 1а). В начальном интервале концентраций (до $3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) эта кривая имеет плато, что отражает полное вовлечение в реакции продуктов радиоллиза ионизированных молекул воды ⁽⁷⁾. Высокий выход дезаминирования, наблюдаемый в области концентрированных растворов ($G(\text{NH}_3) \sim 20$ молекул на 100 эв), можно объяснить вовлечением в реакции дополнительного количества радиоллизированных молекул воды (возбужденных) или разложением получающихся продуктов радиоллиза с образованием NH_3 . Аналогичным образом, судя по концентрационной кривой рис. 1а, происходит образование МДА. Величина выхода дезаминирования в области больших концентраций ДНК зависит от количества растворенного кислорода (рис. 1а).

При изучении пострадикационных эффектов в растворах ДНК и нуклеозидов было установлено, что МДА образуется при распаде гидроперекисей цитозинового и тиминового оснований. В случае ГП цитозина распад происходит по двум механизмам, один из которых ингибируется инозитом, вводимым в раствор после прекращения облучения (рис. 1б). Ниже приведены константы скорости реакций образования МДА при 90° в растворах тимидина, 2-дезокситимидина ($5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) и тех же соединений в присутствии инозита (0,2M):

Тимидин	$8,4 \cdot 10^{-4} \text{ сек}^{-1}$	2-дезокситимидин	$7,6 \cdot 10^{-3} \text{ сек}^{-1}$
Тимидин + инозит	$8,4 \cdot 10^{-4} \text{ сек}^{-1}$	2-дезокситимидин + инозит	$4,6 \cdot 10^{-3} \text{ сек}^{-1}$

Все это позволяет объяснить наблюдавшийся ход концентрационных зависимостей $G(\text{МДА})$ и $G(\text{NH}_3)$ (рис. 1а) протеканием инициированных радикалами процессов образования и распада ГП с участием неповрежденных молекул ДНК, например, по реакции $\text{ROOH} + \text{RH} \xrightarrow{\text{O}_2} \text{RO}_2 + \text{RO} + \text{H}_2\text{O}$ с образованием МДА и NH_3 .

* Концентрация МДА определялась в образцах, сохранявшихся до момента анализа при 0° .

** По оси абсцисс — корень кубический из концентрации ДНК, выраженной в молях на 1 л в расчете на молекулярный вес одного нуклеотида ~ 300 дальтон.

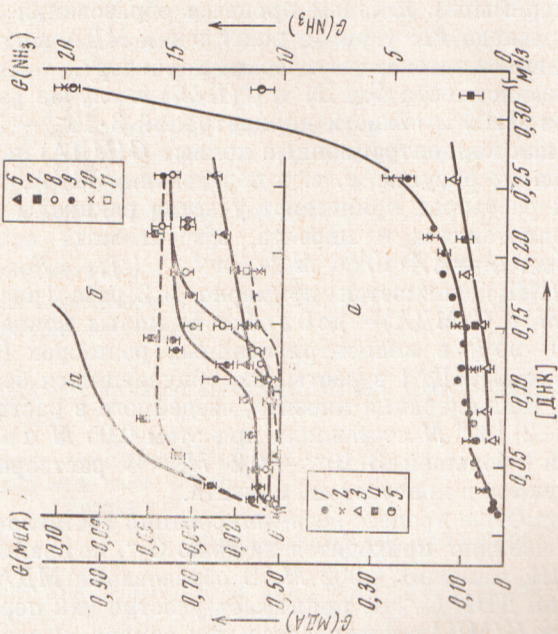


Рис. 1. Зависимость радиационно-химических выходов малонового диальдегида (МДА) и аммиака от концентрации ДНП в растворе. а — растворы насыщены O_2 ; 1 — МДА; 2 — NH_3 ; 3 — NH_3 в присутствии $1 \cdot 10^{-2}$ М пропилгаллата; 4 — NH_3 в присутствии $0,2 \div 0,24$ М инозита; 5 — NH_3 , раствор насыщен смесью O_2 и аргона (1:4); 6 — МДА, растворы насыщены: 6 — O_2 в присутствии инозита; 7 — O_2 , инозит введен после облучения; 8 — аргон; 9 — закисью азота; 10 — аргон в присутствии инозита; 11 — аргон в присутствии $1 \cdot 10^{-2}$ М пропилгаллата

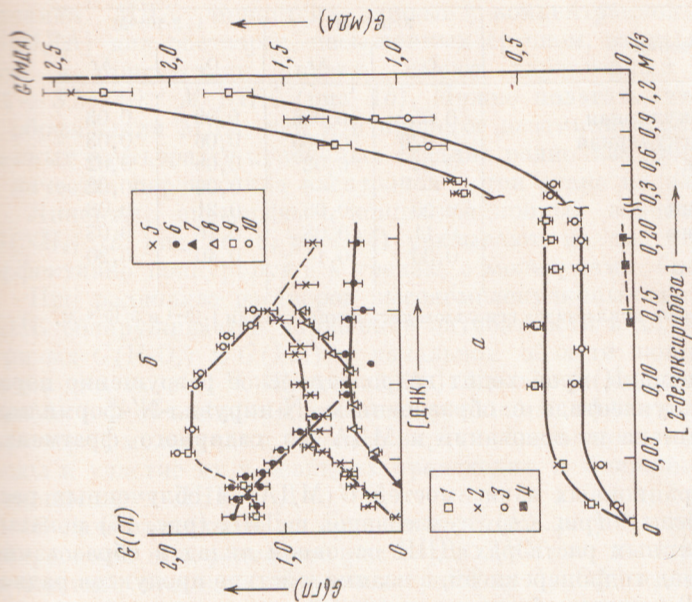


Рис. 2. Концентрационная зависимость выходов накопления МДА в растворах 2-дезоксирибозы (а) и выходов гидроперекисных соединений (ГП) и H_2O_2 в растворах ДНК (б): а — растворы насыщены O_2 (1), закисью азота (2), аргон (3), O_2 и содержат $0,2$ М инозит (4); б — 5 — ГП и 6 — H_2O_2 в растворах низкомолекулярного препарата; 7, 8 — ГП и 9, 10 — H_2O_2 в растворах высокомолекулярного препарата ДНК; 8, 10 — по данным (9)

Инозит, так же как и пропилгаллат (^{7a}), очевидно, ингибирует процесс образования МДА и дезаминирование, выступая в качестве акцептора радикалов, образующихся при распаде гидроперекиси ДНК (^{8, 9}). Разложение ГП может происходить, вероятно, и в результате нерадикального процесса (не ингибируется инозитом) (¹⁰) с отщеплением молекулы воды от 6-оксигидроперекиси с образованием N-пирувил-N'-формилмочевины, например, в тимине (¹¹) и его аналога в цитозине. В условиях анализа продуктов

Таблица 1
Кислородный эффект в растворах ДНК и нуклеозидов *

Соединения	3·10 ⁻⁴ М		1, 5·10 ⁻³ М	
	O ₂	Ar	O ₂	Ar
ДНК низкомолекулярная	0,05	0,005	0,09	0,03
ДНК высокомолекулярная	0,026	0,005	0,06	0,03
2-дезоксцитидин	0,04	0,02	0,08	0,02
Тимидин	—	—	0,06	0,02
2-Дезоксиаденозин	0,20	0,08	0,21	0,08
2-Дезоксигуанозин	0,11	0,08	0,16	0,08
2-Дезоксирибоза	0,30	0,14	0,40	0,20

* В случае растворов нуклеозидов использовались концентрации 1·10⁻⁴ и 3·10⁻³ М, соответственно.

радиолиза ДНК, очевидно, происходит гидролитическое разрушение пораженного пиримидиннуклеотида с образованием N-пирувил-N'-формилмочевины и затем аммиака из оснований и МДА из сахарного фрагмента ДНК.

Анализ концентрационных зависимостей $G(\text{МДА})$ в облученных растворах 2-деоксирибозы * (рис. 2а), нуклеозидов и ДНК (рис. 1б) показывает, что в разбавленных растворах ДНК основной вклад в образование МДА вносит не распад гидроперекисей, а взаимодействие продуктов радиолиза с остатками 2-деоксирибозы, связанными с пуриновыми основаниями.

В концентрированных растворах ДНК, вероятно, вклад процесса образования МДА за счет первичного разрушения 2-деоксирибозного остатка в ДНК становится соизмеримым с вкладом процесса образования МДА за счет инициированного распада ГП (кривая накопления МДА в этой области концентраций ДНК имеет автокаталитический характер).

Концентрационные зависимости $G(\text{ГП})$ и $G(\text{H}_2\text{O}_2)$ в случае радиолиза аэрированных растворов ДНК в области концентраций $3 \cdot 10^{-6} - 3 \cdot 10^{-4}$ М антибатны (рис. 2б) и как концентрационные кривые $G(\text{МДА})$ и $G(\text{NH}_3)$ спрямляются в координатах рисунка, т. е. в образовании МДА, NH_3 , ГП и H_2O_2 в аэрированных растворах принимают участие радикалы OH .

В присутствии пропилгаллата и инозита, эффективных акцепторов радикалов OH ($K_{\text{OH}+\text{ГГ}} = 1,4 \cdot 10^{10} \text{ М}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$ ⁽⁶⁾, $K_{\text{OH}+\text{инозит}} = 1 \cdot 10^9 \text{ М}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$) $G(\text{NH}_3)$ снижается примерно в 2 раза (рис. 1а) до концентрации $1,7 \cdot 10^{-2}$ М, а $G(\text{МДА})$ — до 0 в области малых концентраций ДНК и примерно на 80—90% в концентрированных растворах (рис. 1б) (в сравнении с $G(\text{NH}_3)$ и $G(\text{МДА})$ в растворах, облучавшихся без радиопротекторов (рис. 1а)). Концентрация инозита, введенного в раствор ДНК концентрации $3 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-3}$ М составляла при этом 0,05 М и в растворах ДНК концентрации большей $3 \cdot 10^{-3} - 0,2$ М. В растворах ДНК гидроперекиси не образуются в присутствии инозита.

Таким образом, вклад OH в процесс дезаминирования составляет около 50%. Остальные 50%, очевидно, приходятся на долю O_2^- , по крайней мере, при концентрациях ДНК, меньших 0,002 М. В образовании МДА в этой же области концентраций ДНК O_2^- не принимает участие как переносчик электронов **, поскольку $G(\text{МДА})$ удваивается при замене насыщающего раствор Ar на N_2O . Вклад этого процесса в разбавленных растворах ДНК должен соответствовать разнице ординат между 8 и 9 рис. 1б.

* По данным ⁽¹²⁾ в случае растворов 2-деоксирибозы в реакции с тиобарбитуровой кислотой регистрируется не только МДА, но и другие соединения типа 2-гидрокси-окси-циклогексанон-4.

** Можно было предположить, что O_2 выступает в качестве переносчика электрона и таким образом O_2^- взаимодействует с нуклеотидными звеньями ДНК с образованием МДА. Тогда в дезаэрированных растворах МДА должен был бы образовываться за счет e_{aq} .

При переходе к концентрированным растворам ДНК механизм образования МДА меняется — кривые концентрационных зависимостей $G(\text{МДА})$ для растворов, насыщенных аргоном, закисью азота и кислородом в присутствии инозита имеют характерный излом в области $(1 \div 3,5) \cdot 10^{-3} \text{ М}$ ДНК (рис. 16). Можно полагать, что в этих условиях в образовании МДА, как и в процессе дезаминирования ДНК, в аэрированных растворах в первичных стадиях радиоллиза принимает участие O_2^- в качестве переносчика электронов — при атаке на азотистые основания.

Линейные анаморфозы концентрационных зависимостей $G(\text{МДА})$ и $G(\text{NH}_3)$ (3, рис. 1а; 6, рис. 16) указывают на то, что радиопротекторы эффективно конкурируют в треках с молекулами биополимера за $\text{OH}^\cdot$.

При радиоллизе растворов высокомолекулярных нативных препаратов ДНК обнаруживается нарушение антибатности в ходе концентрационных кривых $G(\text{H}_2\text{O}_2)$ и $G(\text{ГП})$ в начальной области концентраций (рис. 26, наши данные и Г. П. Жижина⁽⁹⁾). Кривая $G(\text{H}_2\text{O}_2)$ проходит через максимум, что объясняется, по нашему мнению, эффектом структурирования раствора молекулами биополимера: образование продуктов радиоллиза воды и участие их в реакциях происходит в ближайших слоях воды по отношению к ДНК.

В качестве одного из сенсibilизаторов распада радиоллизированных молекул воды при радиоллизе растворов ДНК, но не в растворах азотистых оснований, очевидно, может выступать и O_2 . Об этом свидетельствует так называемый кислородный эффект, проявляющийся в большей степени в случае разбавленных растворов низкомолекулярной ДНК (7, 9, рис. 1).

Концентрационная зависимость $G(\text{МДА})$ в растворах ДНК в отсутствие O_2 имеет вид ступенчатой кривой: первая ступенька — в интервале $1 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-3} \text{ М}$, вторая — начиная с $5 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ (рис. 16). Если в первой области концентраций МДА образуется только за счет $\text{OH}^\cdot$, то во второй — в образовании МДА принимает участие и восстановительная компонента радиоллиза воды (кривые 7, 8, 9, рис. 16 сливаются). Дезаминирование в этом случае протекает под действием окислительной и восстановительной компонент радиоллиза воды. Вклад их примерно одинаков. Величины $G(\text{NH}_3)$ в растворах ДНК, $3 \cdot 10^{-2} \text{ М}$ при рН 6,5 имели следующие значения (в скобках указаны добавки):

Продукты радиоллиза	$[\text{ОНe}_{\text{aq}}^-(\text{Ar})]$	$\text{ОН}(\text{N}_2\text{O})$	$\text{ОН}(\text{Ar}, \text{Cd}^{2+})$	$\text{ОН}, \text{O}_2^-(\text{O}_2)$	$\text{O}_2^-(\text{O}_2, \text{инозит})$
ДНК низкомолекулярная	$1,3 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,3$
ДНК высокомолекулярная	—	—	—	$0,58 \pm 0,05$	$0,32 \pm 0,01$

Авторы признательны акад. Н. М. Эмануэлю за обсуждение результатов работы.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
23 III 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. И. Шальнов, Н. П. Крушинская, Тр. МОИП, 16, 99 (1966). ² Е. J. Conway, A. Вугне, Biochem. J., 27, 430 (1933). ³ J. Hochanadel, J. Phys. Chem., 56, 575 (1952). ⁴ G. M. Eisenberg, Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 15, 327 (1943). ⁵ В. А. Шарпаты, М. Т. Наджимиддинова и др., ДАН, 180, 412 (1968). ⁶ Н. В. Закарова, Д. Р. Минхаджиддинова, В. А. Шарпаты, Изв. АН СССР, сер. хим., 1969, 1633. ⁷ В. А. Шарпаты, М. А. Проскурнин, Тр. II Всесоюз. совещ. по радиационной химии, Изд. АН СССР, М., 1962, стр. 122; ^{7а} Н. М. Эмануэль, Сборн. Первичные механизмы биологического действия ионизирующих излучений, Изд. АН СССР, 2, 1963, стр. 73. ⁸ Г. П. Жижина, К. Е. Круглякова, ДАН, 180, 611 (1968). ⁹ Г. П. Жижина, Кандидатская диссертация, М., 1967. ¹⁰ J. Weiss, Organic Peroxides in Radiobiology, London — N. Y., 1958, p. 42. ¹¹ R. Teole, J. Cadet, Bull. Soc. chim. France, 1970, 927. ¹² V. Hartmann, C. V. Sonntag, D. Schulte-Frohlinde, Zs. Naturforsch., 25b, 1394 (1970).