

Г. С. КОМОЛОВА, Э. Н. ТРИФОНОВ, И. А. ЕГОРОВ

## ПОВРЕЖДЕНИЯ СТРУКТУРЫ ДНК В ТКАНЯХ γ-ОБЛУЧЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

(Представлено академиком А. И. Опариным 18 IV 1972)

Лучевое повреждение животного организма при  $\gamma$ -облучении связано с рядом различных изменений на молекулярном уровне. Восстановление нормальной жизнедеятельности клетки после облучения определяется состоянием ее генетического аппарата и, прежде всего ДНК, в которой облучение вызывает целый спектр повреждений. Это, с одной стороны, изменения первичной структуры ДНК (однонитчатые разрывы, модификация оснований и другие), с другой стороны, повреждения вторичной структуры ДНК (локальная денатурация), сопровождающие химические изменения. Указанные повреждения структуры ДНК могут вызывать ряд изменений ее биологических свойств (<sup>1-3</sup>). Нарушение вторичной структуры ДНК при облучении *in vivo* требует всестороннего исследования, тем более что в литературе данные о такого рода изменениях отсутствуют. В данной работе для оценки состояния вторичной структуры ДНК, облученной *in vivo*, применен кинетический формальдегидный метод (к.ф. метод), позволяющий производить количественное определение локально денатурированных участков — дефектов вторичной структуры ДНК (<sup>4</sup>).

$\gamma$ -Облучению ( $\text{Co}^{60}$ ) подвергались крысы-самцы породы Вистар весом 200–250 г. Всего в работе использовано 60 животных. При мощности 200 р/мин доза облучения 650 р соответствовала  $\sim \text{ЛД}_{50}$ . В различные сроки после облучения из декапитированных животных извлекали тимус, селезенку или печень и выделяли из них ДНК детергентным методом (<sup>5</sup>) с многократной депротенизацией (<sup>6</sup>). Выделенные из различных тканей препараты ДНК содержали белка  $< 1\%$  (по Лоури), РНК  $< 6\%$  (орциновый метод). Молекулярный вес препаратов ДНК из облученных и необлученных животных, определенный седиментационным методом, составлял  $7-10 \cdot 10^6$ . Все препараты ДНК диализировали против  $0,03 M \text{NaCl}$ .

Кинетические эксперименты проводили по методике, описанной в работе (<sup>4</sup>) с небольшими изменениями (<sup>7</sup>). Кинетические кривые получали при помощи спектрофотометра СФ-4А, оснащенного самописцем. В части исследуемых образцов ДНК определяли также количество однонитчатых разрывов. Для этого ДНК денатурировали щелочью (<sup>8</sup>) и молекулярный вес однонитчатых фрагментов определяли седиментационным методом (<sup>9</sup>). На рис. 1 приведены типичные кинетические кривые (а) и их анаморфозы (б) для ДНК интактных и облученных крыс. По форме кривые, отвечающие ДНК из облученных животных, не отличаются от аналогичных кинетических кривых для ДНК, облученных *in vitro* (<sup>7</sup>). Произведение кинетических параметров  $Pv$  для этих кривых составляет  $\sim 1,2 \cdot 10^{-4} \text{ мин}^{-2}$ , что также совпадает с соответствующей величиной для ДНК, облученной *in vitro*. Для определения концентрации дефектов  $C$  по изменению  $\Delta I$ , начальной скорости процесса ( $C = \Delta I/2v$ ), ранее была проведена градуировка кинетических измерений в выбранных условиях

(7). Для ДНК тимуса величина параметра  $v$  составила  $(5 \pm 4)$  мин<sup>-1</sup>. Данные выполненных таким образом измерений концентрации дефектов вторичной структуры ДНК, выделенной из тимуса облученных животных, приведены в табл. 1. Величина  $v$  принята равной 5 мин<sup>-1</sup>.

Из представленных результатов следует, что через 15 мин. после облучения в ДНК тимуса животных, облученных в дозе, соответствующей ~ЛД<sub>50</sub>, возникает  $1,3 \pm 0,4$  дефектов на 10 000 пар нуклеотидов. Через

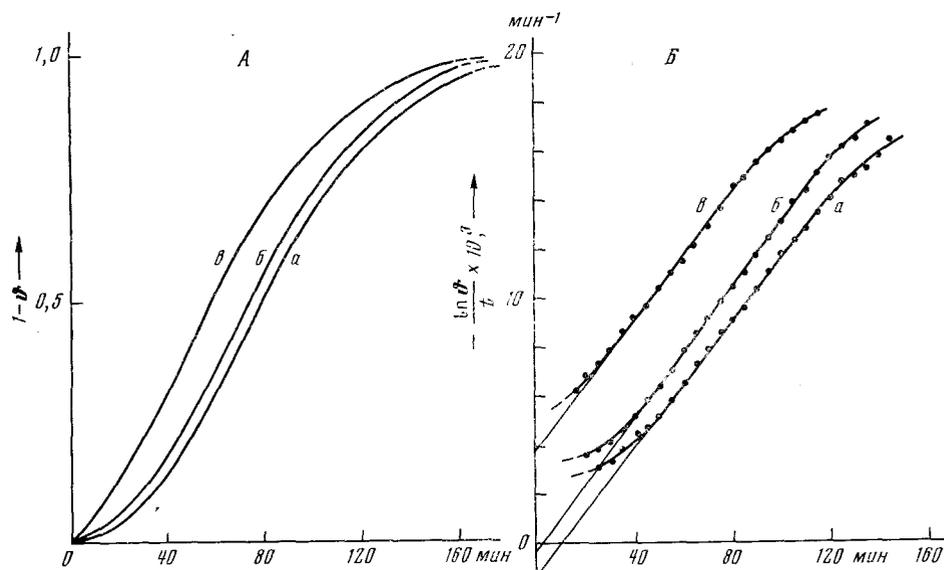


Рис. 1. Кинетические кривые (А) и их анаморфозы (Б) для ДНК тимуса крыс. а — ДНК интактных животных; б — ДНК облученных животных (доза 650 р), выделенная через 1 час после облучения; в — ДНК облученных животных (доза 650 р), выделенная через 3 часа после облучения

час количество дефектов остается приблизительно тем же и заметно увеличивается только через 3 часа после облучения. В последующие 15 час. количество дефектов вторичной структуры ДНК практически не изменяется. В ранние сроки после облучения происходит также накопление дефектов в структуре ДНК селезенки, хотя несколько в меньшей степени, чем в ДНК тимуса. Через 18 час. после облучения концентрация дефектов в ДНК селезенки составляет  $4,5 \cdot 10^{-4}$ . В то же время в ДНК радиорезистентной ткани (печени) концентрация дефектов значительно меньше и составляет  $1,6 \cdot 10^{-4}$ . Это свидетельствует о тканевой специфичности в нарушении вторичной структуры ДНК животных в пострadiационный период.

Дефекты вторичной структуры, образующиеся в ДНК сразу после облучения (~15 мин. — длительность первой стадии экстракции ДНК) могут быть вызваны как первичным, так и вторичным опосредованным действием излучения.  $\gamma$ -Облучение ДНК *in vitro* в той же дозе 650 р приводит к образованию в ней дефектов вторичной структуры в концентрации  $\sim 0,5 \cdot 10^{-4}$  (7). Однако эта величина не может служить для оценки роли первичных повреждений в наблюдающемся сразу после облучения суммарном эффекте ( $\sim 1,3 \cdot 10^{-4}$ ), так как условия, в которых находятся молекулы ДНК при облучении *in vitro* и *in vivo*, существенно отличаются. Через 3 часа после облучения и позже повреждения в ДНК вызываются главным образом нуклеазами, индуцирующими в ДНК тимуса облученных животных однонитевые разрывы (10). Известно, что образование однонитевого разрыва в молекуле ДНК связано с ее локальной денатура-

Таблица 1

Концентрация вызванных облучением дефектов вторичной структуры ( $C$ ) и односторонних разрывов ( $C^1$ ) в ДНК, выделенной из тимуса крыс в разные сроки после облучения

Время после облучения	$C \cdot 10^4$	$C^1 \cdot 10^4$	Время после облучения	$C \cdot 10^4$	$C^1 \cdot 10^4$
Без облучения	0	0	3 часа	$6,1 \pm 0,3$	$4,8 \pm 0,5$
15 мин.	$1,3 \pm 0,4$	—	6 час.	$6,6 \pm 0,4$	$5,9 \pm 0,6$
1 час.	$1,1 \pm 0,2$	—	час.	$6,5 \pm 0,4$	$5,3 \pm 0,6$

Примечание. Каждое значение  $C$  и  $C^1$  получено при анализе ДНК, выделенной из тканей, взятых от 10 животных.

ций, так что каждому разрыву отвечает дефект вторичной структуры ( $C^1$ ). Используя методику, описанную в работе (<sup>9</sup>), мы определили число разрывов в тех же препаратах ДНК, выделенной из тимуса в пострадиационный период. Результаты этих определений концентрации односторонних разрывов ( $C^1$ ) также приведены в табл. 1. Сравнивая полученные значения с концентрациями ( $C$ ) дефектов вторичной структуры, приведенными в табл. 1, можно заключить, что во всяком случае большая часть дефектов вторичной структуры ДНК, выделенной из тканей животных через несколько часов после облучения, связана с имеющимися в этой ДНК односторонними разрывами.

Институт биохимии им. А. Н. Баха  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
17 IV 1972

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> J. D. Karkas, E. Chargaff, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 58, 1645 (1967).  
<sup>2</sup> С. Г. Камзолова, В. Ф. Маняков и др., Мол. биол., 3, 74 (1969). <sup>3</sup> F. L. Bollum, J. Biol. Chem., 235, 2399 (1960). <sup>4</sup> Э. Н. Трифионов, Н. Н. Шафрановская и др., Мол. биол., 2, 887 (1968). <sup>5</sup> E. R. Kay, N. S. Simmons, A. L. Doumpe, J. Am. Chem. Soc., 74, 1724 (1952). <sup>6</sup> J. Marmur, J. Mol. Biol., 3, 203 (1961). <sup>7</sup> Г. С. Комолова, Э. Н. Трифионов, И. А. Егоров, ДАН, 207, № 1 (1972). <sup>8</sup> P. F. Davison, D. Freifelder, B. W. Holloway, J. Mol. Biol., 8, 1 (1964). <sup>9</sup> U. Hagen, Biochim. et biophys. acta, 134, 45 (1967). <sup>10</sup> Б. П. Иванов, Н. И. Рябченко, Радиобиология, 9, 1, 7 (1969). <sup>11</sup> Ю. А. Банников, Э. Н. Трифионов, Мол. биол., 4, 733 (1970).