

УДК 577.11

БИОХИМИЯ

Г. А. КРИТСКИЙ, С. В. АЛЕКСАНДРОВ

ДИАГНОСТИКА РАДИАЦИОННОГО ПОРАЖЕНИЯ ОРГАНИЗМА ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КРОВИ

(Представлено академиком А. И. Опариным 11 IX 1972)

В настоящее время из методов биохимической диагностики лучевого поражения наиболее известны те, которые основаны на следующих принципах: определение выделения с мочой дезоксицитидина таурина, креатина, псевдоуридина и некоторых других компонентов мочи, определение содержания сывороточных белков и активности ферментов крови (¹⁻⁷).

В настоящем исследовании мы ставили себе цель упростить ранее описанную нами (⁸) методику диагностики лучевого поражения по определению нуклеиновых кислот в крови.

Материал и методика. При выборе и модификации методики мы использовали данные работ ряда авторов по микрометодикам определения нуклеиновых кислот (⁹⁻¹¹), а также исходили из данных наших предыдущих исследований (^{12, 13}), в которых было показано, что в нуклеиновых кислотах, выделенных из тканей организма в период острого лучевого поражения (1-6 суток после облучения), относительное содержание примеси остаточного белка значительно увеличивается.

Это увеличение примеси белка само по себе может быть дополнительным тестом на радиационное поражение. В соответствии с этим при спектрофотометрии в ультрафиолетовом свете экстрактов, содержащих продукты гидролиза нуклеиновых кислот, мы учитывали как поглощение, характеризующее содержание нуклеиновых кислот, так и поглощение, характеризующее содержание примесей.

Принцип. Небольшой точно измеренный объем крови смешивается с гемолизирующим веществом, не повреждающим белые кровяные клетки. Последующее центрифугирование и декантация надосадочной жидкости удаляет гемоглобин. Нуклеиновые кислоты из осадка лейкоцитарной массы экстрагируются с помощью хлорной кислоты. Производится спектрофотометрия экстракта в ультрафиолетовом свете при трех длинах волн. По полученным данным вычисляется содержание нуклеиновых кислот в лейкоцитарной массе крови и величина показателя, отражающего количество примесей в экстракте.

Объект исследования, реактивы и ход анализа. Исследование выполнено на белых крысах линии «Вистар» обоего пола. Облучение животных производили на рентгеновской установке типа РУП 200.20.5 190 кв. 20 ма.

Фильтры: Cu 0,5 мм, Al 0,75 мм. Дозы: от 2 р до 500 р. Время облучения — не более 25 мин. (при дозе 2 р — 1 мин.). В каждом опыте использовали также контрольных, необлученных животных, которые содержались в точно таких же условиях, как облученные. Непосредственно перед забиванием животных готовили гемолизирующий раствор сапонины в воде: 1 вес. часть сапонины на 8000 объемов дистиллированной воды. Раствор сапонины наливали в центрифужные пробирки для анализа, животных забивали декапитацией. Как правило, в опыт брали 4 контрольных и 4 облученных крысы. За 2-3 часа до забоя корм у крыс отнимали, оставляя только воду. Кровь от каждой крысы собирали отдельно при помехи-

вании в выпарительные фарфоровые чашечки, на дно которых предварительно помещали по капле раствора гепарина. На анализ в одну пробирку обычно брали по 3,0 мл раствора сапонины и 1,5 мл крови. От каждой крысы ставили две параллельные пробы. Смесь сапонины и крови перемешивали для гемолиза. Затем пробирки центрифугировали 10 мин. при 6 тыс. об./мин., надстоящий раствор удаляли декантацией. К осадку лейкоцитарной массы добавляли по 4 мл 0,5 N HClO₄, осадки перемешивали стеклянными палочками и, не вынимая палочек из пробирок, ставили последние в водяной термостат на 15 мин. при 70°. Затем пробирки вынимали из термостата, охлаждали в ледяной воде, осадки еще раз растирали теми же стеклянными палочками. Стеклянные палочки удаляли, пробирки центрифугировали, хлорнокислотные экстракты сливали в чистые сухие пробирки и спектрофотометрировали на СФ.4А, определяя экстинкции (Е) при длинах волн: 230, 265 и 290 мμ. Спектрофотометрирование производилось при использовании в качестве контроля раствора 0,5 N HClO₄, прогретого таким же образом, как и опытные образцы.

Расчет. Усредняли показания параллельных проб. Концентрацию нуклеиновых кислот в крови (С) вычисляли по следующей общей формуле:

$$C = \frac{(A - B) V_2 \cdot 1,03}{V_1},$$

где $A = 3,571 \cdot E_{265}$, $B = 0,802 \cdot E_{230}$, V_1 — объем крови, взятый на анализ в пробу (в мл), V_2 — объем 0,5 N HClO₄ (в мл), взятый в пробу для экстракции нуклеиновых кислот, C — количество нуклеиновых кислот (мг) в лейкоцитарной массе от 100 мл крови.

Коэффициент K , характеризующий чистоту хлорнокислотного экстракта нуклеиновых кислот, определяли по общей формуле

$$K = \frac{C \cdot V_1}{E_{290} \cdot V_2} = \frac{(A - B) 1,03}{E_{290}}.$$

В каждом опыте вычисляли также $C_{обл}$ и $K_{обл}$ в процентах от соответствующих величин для нормы. Всего в настоящем исследовании выполнено около 40 опытов и использовано около 350 животных.

Результаты и обсуждение. Полученные нами результаты приведены в табл. 1 и на рис. 1. Из таблицы видно, что уменьшение содержания нуклеиновых кислот в лейкоцитарной массе крови через двое суток после облучения статистически достоверно, начиная от дозы 5 р и выше. Показатель K также закономерно уменьшается с увеличением дозы облучения. Это изменение не столь отчетливо выражено, как изменение содержания нуклеиновых кислот. Однако, судя по полученным нами результатам, учет показателя K дает полезную дополнительную попутно получаемую информацию о наличии или отсутствии радиационного повреждения. В то время как показатель C характеризует количественную сторону, показатель K характеризует качественную сторону изменений. Наблюдаемая корреляция изменений двух показателей C и K способствует повышению надежности метода в целом.

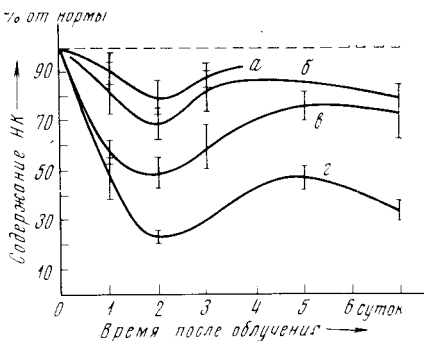


Рис. 1. Изменение относительного содержания нуклеиновых кислот в крови в разные сутки после рентгеновского облучения животных. а — 2 р, б — 5 р, в — 50 р, г — 500 р

Наиболее существенные результаты исследования изменений в крови в другие сроки после облучения представлены на рис. 1. Из рисунка видно, что примерно до двух суток после облучения в крови преобладает процесс распада нуклеиновых кислот, тогда как в ближайшие последующие сутки содержание нуклеиновых кислот в крови постепенно увеличивается.

Рис. 1 также показывает отчетливую тенденцию уменьшения содержания нуклеиновых кислот в крови уже после облучения организма в таких малых дозах, как 2 р.

Описанный метод, вероятно, может служить полезным дополнением к тем методам диагностики лучевого поражения, которые не чувствительны к столь малым дозам облучения, но с помощью которых можно дифференцировать действие различных доз ионизирующей радиации в более высоких диапазонах.

Таблица 1

Изменение некоторых показателей крови крыс через 2 суток после рентгеновского облучения животных в разных дозах

Показатели радиационного поражения	Доза облучения	5 р	50 р	200 р	500 р
С	Норма (Н)	$6,45 \pm 0,36$	$5,82 \pm 0,27$	$6,65 \pm 0,72$	$4,45 \pm 0,12$
	Облучение (О)	$4,48 \pm 0,40$	$2,85 \pm 0,35$	$2,81 \pm 0,28$	$1,51 \pm 0,14$
	Достоверность различия (Н) и (О)	$P < 0,05$	$P < 0,001$	$P < 0,01$	$P < 0,001$
К	Норма (Н)	$6,85 \pm 0,31$	$7,11 \pm 0,19$	$6,52 \pm 0,25$	$6,07 \pm 0,21$
	Облучение (О)	$4,99 \pm 0,67$	$5,96 \pm 0,33$	$4,87 \pm 0,19$	$3,66 \pm 0,24$
	Достоверность различия (Н) и (О)	$P > 0,05$	$P < 0,01$	$P < 0,01$	$P < 0,001$

Так, недавно Калимо-Сегрето и Людвиг ⁽¹⁴⁾ описали метод биологической дозиметрии по исследованию соотношения ядерных и не ядерных клеточных элементов в костном мозгу. Этот метод годится для биологической дозиметрии в интервалах доз от 150 до 1000 р.

Если полученные нами данные сравнить с другими известными из литературы тестами на лучевое поражение, то становится очевидным, что определение содержания нуклеиновых кислот в крови может обеспечить обнаружение изменений после облучения животного в более низких дозах, чем это выявляется с помощью известных до настоящего времени биохимических методов.

Описанная нами экспериментальная процедура в наибольшей мере соответствует методу Моретти и соавторов ⁽⁹⁾. Однако в работе этих авторов не был исследован вопрос о влиянии ионизирующей радиации на содержание нуклеиновых кислот в крови. Спектрофотометрию хлорнокислотных экстрактов авторы производили не при трех, а при двух длинах волн (λ_{265} и λ_{230}). Кроме того, Моретти и сотрудники относили определяемую ими величину *С* целиком за счет содержания в лейкоцитарной массе ДНК. Так как фактически содержание РНК в лейкоцитах составляет не менее 20—30% от общего количества нуклеиновых кислот, то мы считаем более правильным относить величину *С* за счет суммы нуклеиновых кислот, содержащихся в лейкоцитарной массе.

В упомянутой работе Моретти и соавторов ⁽⁹⁾ указывается что между величиной *С* и содержанием лейкоцитов в крови есть прямая пропорциональность. Однако И. Б. Фридланд и соавторы на основании результатов своих исследований ⁽¹⁵⁾ считают, что между количеством лейкоцитов и содержанием нуклеиновых кислот в крови нет прямой зависимости. Воз-

можно, что содержание нуклеиновых кислот, приходящееся в среднем на один лейкоцит, при лучевом поражении меньше, чем в норме.

Во всяком случае, остается несомненным тот факт, что методом счета лейкоцитов в крови не удастся обнаружить вызванные облучением изменения при дозах менее чем 25 р, тогда как из настоящего исследования видно, что метод определения нуклеиновых кислот в крови позволяет обнаруживать радиационные изменения после облучения в дозах 2—5 р.

Таким образом в исследовании по рентгеновскому облучению крыс упрощена ранее описанная авторами методика диагностики радиационного повреждения организма по определению нуклеиновых кислот в крови. Лейкоцитарная масса крови экстрагируется хлорной кислотой и производится спектрофотометрия экстракта в ультрафиолетовом свете при трех длинах волн. По полученным величинам экстинкций рассчитываются уменьшение содержания нуклеиновых кислот, а также показатель (K), характеризующий изменение количества примесей в экстракте. Метод позволяет обнаружить статистически достоверные изменения в организме в разные сутки после облучения в дозах от 5 р. и выше. Наблюдаемые отклонения от нормы увеличиваются с увеличением дозы облучения. В методике требуется 0,5—1,5 мл крови в пробу. Время анализа 1—2 часа. Можно вести 20 и более параллельных анализов одновременно.

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

Поступило
11 IX 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ K. I. Altman, J. B. Gerber, S. Okada, *Radiation Biochemistry*, 1, 2, N. Y.—London, 1970. ² Т. А. Федорова, М. П. Тараканова и др., *Бюлл. эксп. биол. и мед.*, 71, № 1, 34 (1971). ³ М. М. Скурихина, О. Я. Терещенко, *Радиобиология*, 3, № 6, 829 (1963). ⁴ О. Я. Терещенко, М. П. Тараканова, *Радиобиология*, 8, № 6, 863 (1968). ⁵ М. Я. Богомазов, Н. А. Федоров, М. С. Филимошина, *Радиобиология, Радиотерапия*, 10, № 5, 646 (1969). ⁶ *Biochemical Indicators of Radiation Injury in Man*, Proc. Sci. Meeting of biochem. Indicat. of Radiation Injury in Man 22—26 June, 1970, Vienna, 1971. ⁷ Ю. А. Колесников, Г. Т. Черненко, В. Н. Жижин, *Медиц. радиол.*, 16, № 1, 74 (1971). ⁸ Г. А. Критский, А. А. Абидов и др., *Радиобиология*, 10, № 6, 803 (1970). ⁹ J. Moretti, T. Staefgen et al., *Pathol. Biol.*, 19, № 11—14, 679 (1971). ¹⁰ П. В. Симаков, *Вопросы питания*, № 6, 69 (1960). ¹¹ Р. Цанев, Г. Г. Марков, *Biochim. et biophys. acta*, 42, 442 (1960). ¹² Г. А. Критский, В кн. *Нуклеиновые кислоты и биологическое действие ионизирующей радиации*. Матер. Симпоз. 9—11 дек. 1965. «Наука», 1967, стр. 44. ¹³ Г. А. Критский, *Радиобиология*, 7, № 2, 193 (1967). ¹⁴ M. M. Calim Segreto, F. Lidwig, *Compt. Rend. Acad. Sci., Paris*, 274, № 18, 2610 (1972). ¹⁵ И. Б. Фридлянд, М. Б. Гинзбург и др., *Мед. радиол.*, 16, № 1, 22 (1971).