

УДК 577.391

БИОФИЗИКА

М. И. СУХОВИЯ, А. В. КОВАЛЬЧУК, Э. Н. ТРИФОНОВ

ДЕЙСТВИЕ ИОНИЗИРУЮЩИХ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ИЗЛУЧЕНИЙ НА ДНК В РАСТВОРЕ И НА БЕЛЫЕ КЛЕТКИ КРОВИ

(Представлено академиком Г. М. Франком 21 VII 1975)

Известно, что коэффициенты относительной биологической эффективности (о.б.э.) ионизирующей радиации, измеряемые обычно на сложных биологических системах, значительно варьируют от объекта к объекту ⁽¹⁾, что затрудняет сопоставление действия различных излучений, а также трактовку возможных причин повреждения. Поэтому представляет интерес определение о.б.э. с использованием сравнительно простых молекулярных и клеточных тестов, что позволило бы получать не только количественно повторяющиеся результаты, но и пролить свет на механизмы лучевого поражения. На перспективность такого подхода указывают, например, результаты исследований ^(2, 3).

Настоящая работа посвящена исследованию действию рентгеновских лучей различных энергий и тормозных γ -квантов бетатрона на ДНК в водных растворах и на ядерные структуры лейкоцитов.

Облучение ДНК и лейкоцитов осуществляли с помощью установок РУМ-13 ($U=180$ кв, 280 р/мин), РУМ-7 ($U=40$ кв, 270 р/мин) и бетатрона Б-2 с максимальной энергией 25 Мэв при мощности дозы 280 р/мин. Дозы рентгеновских лучей измеряли рентгенометром РМ-1М и термолуминесцентным дозиметром ТДП-2, для дозиметрии тормозного излучения применяли абсолютную камеру Флауэрс. О.б.э. данных видов радиации оценивали по концентрация дефектов, вызываемых ими во вторичной структуре ДНК (молекулярный тест) и по изменению эффективного времени «гибели» флуорохромированных лейкоцитов (клеточный тест) ⁽⁴⁾.

ДНК выделяли из зобной железы теленка фенольным методом. Концентрация белка в препаратах, определяемая по Лоури ⁽⁵⁾, не превышала 2%. Молекулярный вес ДНК, измеренный с помощью электронного микроскопа, равнялся $2,4 \cdot 10^6$. Концентрацию дефектов с вторичной структуры ДНК измеряли параллельно кинетическим формальдегидным (к.ф.) и термодинамическим (т.д.) методами ^(6, 7), градуировку которых осуществляли с помощью фрагментированной ультразвуком ДНК молекулярного веса $2,8 \cdot 10^5$. Концентрация с дефектов вторичной структуры в ДНК, определяемая к.ф.- и т.д.-методами, связана с измеряемыми величинами следующими соотношениями

$$c = \frac{\Delta I}{2\nu}, \quad (1)$$

$$c = A[(\Delta T)^2 - (\Delta_0 T)^2], \quad (2)$$

где ΔI — изменение начальной скорости деспирализации ДНК под действием формальдегида, ν — константа скорости роста зародышей деспирализации, $\Delta_0 T$ и ΔT — ширины интервалов плавления исходной и облученной ДНК, A — градуировочная константа. Для использованных условий кинетического эксперимента (рН 8,7; 0,04 М NaCl, 54°, концентрация CH_2O 2,1%) константа ν равна $(2,3 \pm 0,4)$ мин⁻¹. Для константы A , отвечающей полной силе 0,015, получена величина $7,2 \cdot 10^{-6}$ град⁻².

Из основных выражений теории к.ф.-метода ⁽⁶⁾ вытекает формула

$$c \simeq \left(1 - \frac{t_{0,5}}{t_{0,5}^0}\right) \sqrt{\frac{p}{v} \ln 2}, \quad (3)$$

где $t_{0,5}$ и $t_{0,5}^0$ — времена половинной деспирализации облученной и исходной ДНК, p — константа скорости иницирования зародышей деспирализации. Эта формула предложена авторами работы ⁽⁸⁾ как еще один способ определения концентрации дефектов из кинетических кривых деспирализации ДНК под действием формальдегида.

Лейкоциты исследовали в составе периферической крови, отбираемой из ушной вены кролика непосредственно перед опытом. В качестве стабилизатора использовали 3%-ный раствор цитрата Na. Эффективное время t

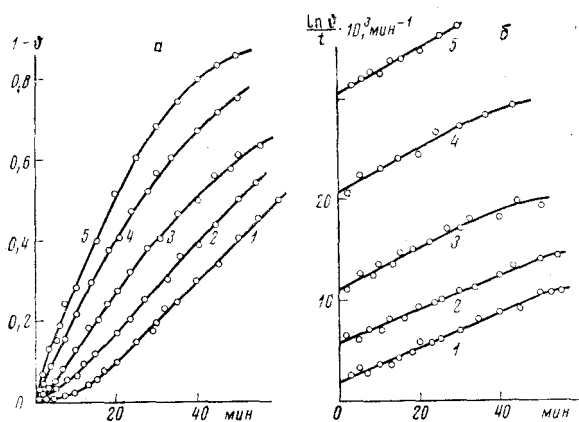


Рис. 1

Рис. 1. Кинетические кривые (а) и их анаморфозы (б) для ДНК, облученной различными дозами γ -квантов бетатрона: 1 — контроль; 2 — 3,1 кр; 3 — 6,0 кр; 4 — 11,4 кр; 5 — 17,3 кр

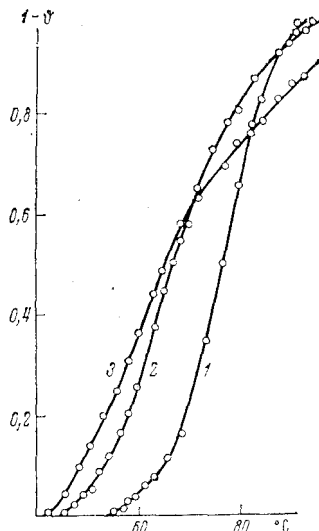


Рис. 2

Рис. 2. Кривые плавления ДНК, подвергнутой γ -облучению в различных дозах. 1 — контроль; 2 — 16,8 кр; 3 — 22,5 кр

«гибели» лейкоцитов (т. е. время, в течение которого «погибает» 50% клеток) определяли по разработанной ранее ⁽⁴⁾ методике выявления деструктивных изменений в клетках путем длительной их экспозиции с флуорохромом акридиновым оранжевым. В опытах использовали люминесцентный микроскоп МЛ-2 (возбуждающий фильтр СС-15).

На рис. 1, 2 приведены кинетические кривые, их линейные анаморфозы и кривые плавления для исходной нативной ДНК и для ДНК, облученной различными дозами тормозных γ -квантов бетатрона. Как видно из графиков, с дозой радиации возрастает начальная скорость I деспирализации ДНК под действием формальдегида, соответственно уменьшается время $t_{0,5}$ половинной деспирализации. Облученная ДНК существенно отличается от исходной и тем, что плавление ее структуры происходит при меньших температурах. При этом снижение температуры T_m перехода «спираль — клубок» сопровождается расширением интервала плавления ΔT . Качественно аналогичные зависимости получены и для ДНК, подвергшейся воздействию рентгеновской радиации (40 и 180 кв).

Выявленные закономерные изменения параметров I , $t_{0,5}$ и ΔT от дозы облучения позволяют с помощью уравнений (1–3) тремя различными спо-

собами определить концентрации дефектов c в облученных препаратах ДНК. Анализ кинетических кривых и кривых плавления, приведенных на рис. 1 и 2, показал, что минимальная концентрация дефектов, регистрируемая к.ф.-методом, составляет $\sim 0,2 \cdot 10^{-3}$. Определение по $t_{0,5}$ дает минимальную измеряемую концентрацию $\sim 0,5 \cdot 10^{-3}$. Наконец, чувствительность т.д.-метода составляет $\sim 1,0 \cdot 10^{-3}$. Таким образом, с наименьшей погрешностью концентрация дефектов определяется к.ф.-методом (формула (1)), предел чувствительности которого к излучению составляет в данном случае ~ 500 р.

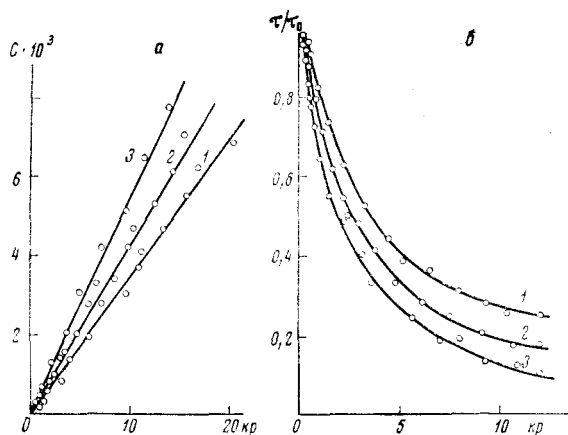


Рис. 3. Зависимость концентрации дефектов вторичной структуры ДНК (а) и эффективного времени гибели лейкоцитов (б) от дозы γ -квантов (1), рентгеновских лучей 40 кв (2) и 180 кв (3)

На относительно малую точность и чувствительность термодинамических измерений указывает исследование (⁷). Что касается второго варианта применения к.ф.-метода (формула (3)), то к выводу о небольшой точности определений концентрации дефектов этим способом приводит также несложный анализ формулы (3). Действительно, относительная погрешность измерения величин $t_{0,5}$ и $t_{0,5}^0$ составляет $\sim 10\%$, откуда следует, что

Таблица 1

Коэффициенты К о.б.з. излучений

Тест	40 кв (180 кв)	25 Мэв (180 кв)	25 Мэв (40 кв)
Молекулярный (с)	$0,79 \pm 0,05$	$0,64 \pm 0,06$	$0,81 \pm 0,06$
Клеточный (τ/τ^0)	$0,77 \pm 0,05$	$0,61 \pm 0,06$	$0,78 \pm 0,06$

Примечание. В скобках указана энергия излучения, относительно которого определяются соответствующие коэффициенты.

абсолютная ошибка определения величины c по формуле (3) составляет $\sim 0,2\sqrt{(p/v) \ln 2}$. Это отвечает концентрации дефектов $\sim 10^{-3}(p/v=3 \cdot 10^{-5})$, что согласуется с экспериментальной величиной чувствительности такого способа определения концентрации дефектов. Использование к.ф.-метода в его обычном варианте (формула (1)) позволяет регистрировать существенно меньшие концентрации дефектов (рис. 3а). Ниже для сравнения действия γ - и рентгеновских излучений использованы лишь значения c , полученные к.ф.-методом.

Рис. 3 иллюстрирует изменение концентрации дефектов в ДНК и эффективного времени «гибели» лейкоцитов с дозой облучения. Для всех трех видов излучения дозовые зависимости концентрации дефектов можно

описать линейной, а эффективного времени «гибели» лейкоцитов — логарифмической функцией. Сравнительно простые функциональные зависимости доза — эффект дают возможность путем сопоставления степени повреждения, приходящейся на единицу дозы каждого из исследуемых видов радиации, определить коэффициенты о.б.э. Численные значения последних, приведенные в табл. 1, свидетельствуют о том, что наибольшее количество повреждений как в структуре ДНК, так и в ядрах лейкоцитов вызывают 180-киловольтные рентгеновские лучи, несколько меньшие изменения наблюдаются после действия рентгеновских лучей с напряжением генерирования 40 кв, а тормозные γ -кванты наименее эффективны.

Наблюдаемые различия в о.б.э. рентгеновского (180 и 40 кв) и тормозного излучений объясняются, по-видимому, в первую очередь различиями в величинах линейного поглощения энергии (л.п.э.), характеризующих эти излучения (3,0; 0,47 и 0,27 кэв/нм соответственно). На величине о.б.э. бетатронного излучения может сказываться также ультрафракционированный характер этого излучения (~ 100 имп/сек). Факт отличия биологических эффективностей исследованных излучений отмечался и ранее рядом авторов. Это наблюдалось, например, при сравнении величин ЛД_{50/30} для мышей, облученных рентгеновскими лучами с разной энергией (⁹), по иммунологическим показателям (¹⁰) и по выходу фага в лизогенных культурах *Escherichia coli* (сравнение γ -излучения бетатрона, 25 Мэв, и рентгеновского излучения, 200 кв (¹¹)).

Итак, приведенный экспериментальный материал свидетельствует о том, что молекулярный тест (концентрация дефектов вторичной структуры ДНК) и хорошо коррелирующий с ним клеточный (эффективное время «гибели» облученных клеток) являются удобными способами для определения о.б.э. разных видов радиации. Они отвечают всем основным требованиям, предъявляемым к такого рода критериям: имеют простые зависимости доза — эффект, достаточную чувствительность, отражают характерные для действия излучений биологические реакции и обеспечивают получение повторяющихся количественных данных. Исследованные молекулярный и клеточный тесты могут применяться для радиобиологической дозиметрии.

Ужгородский государственный
университет

Поступило
22 V 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. Г. Даренская, Л. Б. Кознова и др., Относительная биологическая эффективность излучений. Фактор времени облучения, М., Атомиздат, 1968. ² E. Csagoly, J. Polarographic Soc., № 1 (1959). ³ Я. Л. Шехтман, И. Брейкш, В. А. Стручков, Радиобиология, т. 6, в. 4, 495 (1966). ⁴ М. И. Суховия, Радиобиология, т. 14, 3, 441 (1974). ⁵ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., v. 193, 265 (1951). ⁶ Э. Н. Трифонов, Н. Н. Шафрановская и др., Мол. биол., т. 2, 6, 887 (1968). ⁷ И. В. Берестецкая, Ю. Н. Косаганов и др., Мол. биол., т. 4, 1, 137 (1970). ⁸ А. М. Поверенный, Н. И. Рябченко и др., Мол. биол., т. 6, 524 (1972). ⁹ E. Alpen, Radiology, v. 70, 541 (1958). ¹⁰ В. М. Шубик, В. А. Колотевин и др., Радиобиология, т. 11, 540 (1971). ¹¹ Б. А. Цибульский, А. Н. Кронгауз и др., Мед. радиобиол., т. 12, 3 (1967).