

УДК 577.3

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРОНИЧЕСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ В ЗОНЕ ЧЕРНОБЫЛЯ НА СТРУКТУРУ ДНК.**С. В. Корнилова***Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины, 310164, Харьков, пр. Ленина, 47, E-mail: kornilova@ilt.kharkov.ua*

Методами вискозиметрии, термической денатурации, ИК-спектроскопии, электрофореза изучены свойства ДНК животных, подвергавшихся длительному облучению в условиях Чернобыльской зоны. В препаратах ДНК, выделенных из печени и селезенки, обнаружено аномально большое количество низкомолекулярной ДНК, количество которой увеличивается в последующих поколениях животных, а также с возрастом животного. Особенно сильно этот эффект выражен для ДНК, выделенной из печени. Показано, что низкомолекулярная ДНК обогащена ГЦ-парами и состоит из четырех фракций: 1) ~ 500 пар нуклеотидов (п.н.), 2) ~ 1,5~2 тыс. п.н., 3) ~ 4~5 тыс. п.н. и примеси с ~ 20 тыс. п.н. Обнаружено также, что препараты ДНК, полученные из тканей опытных животных, содержат в десятки раз большее количество железа, цинка, селена и других элементов по сравнению с контрольными препаратами. Добавление Cu в пищу животных, постоянно проживающих в зоне, усиливает влияние радиации. Модельные эксперименты при комбинированном воздействии облучения и ионов Cu на ДНК из лимфоцитов крови обнаружили синергизм их действия. В сравнении с ионами меди цинк оказывает меньшее воздействие на физико-химические свойства ДНК. Результаты экспериментов по изучению свойств ДНК из регенерировавших клеток печени после операции гепатэктомии у длительно облученных животных подтверждают увеличение замаскированных повреждений ДНК в результате облучения, что проявляется в появлении НМ фракции ДНК, количество которой достигает 65%. Предложена модель повреждения ДНК при действии малых доз ионизирующего излучения и ионов Mt^{2+} .

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК, хроническое облучение, низкомолекулярная фракция, вискозиметрия, ИК-спектроскопия, ионы металлов

В настоящее время актуальным является изучение длительного радиационного воздействия небольшой интенсивности на живой организм. Особенно существенны в этой связи данные о пострадиационных изменениях ДНК животных, помогающие понять механизмы повреждения генетического аппарата [1, 2]. Такие исследования в реальных условиях усложняются факторами, которые способны изменять действие радиации на геном животных. В частности, это могут быть ионы металлов, которые, как известно, имеют высокие константы связывания с нуклеиновыми кислотами и способны модифицировать действие радиации на ДНК [3, 4]. Особая роль в радиационном повреждении связей ДНК-белок и структуры хроматина отводится ионам Cu^{2+} . Частично это обусловлено тем, что участки ДНК, связанные с Cu^{2+} , становятся более радиочувствительными [5].

В связи с изложенным, нами изучалось влияние постоянного внешнего и внутреннего облучения, небольшой интенсивности, а также ионов Cu^{2+} и Zn^{2+} на структуру ДНК белых беспородных крыс нескольких поколений, постоянно находившихся в Чернобыле. Для выяснения механизмов разрушения ДНК в этих условиях были проведены модельные эксперимент по облучению животных и культуры клеток лимфоцитов в присутствии ионов Cu^{2+} .

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

Использовали белых беспородных крыс из четвертого - седьмого поколений различных возрастных групп, находившихся в зоне Чернобыля 1991-1992 гг. Первое поколение было размещено в зоне в марте 1989 г. Животные получали пищу, взятую из зоны. Специфическая активность дневного рациона, содержащего ^{134}Cs , ^{137}Cs , ^{89}Sr , ^{90}Sr , ^{40}K , составляла 80 ± 154 Вq/день. В течение жизни животные подвергались действию хронического комбинированного излучения. Полная доза внешнего γ излучения не превышала 2 сGy в течение жизни животных. В месте содержания животных доза γ -компоненты составляла 20-27 μ г/час. Специфические активности элементов, инкорпорированных в кости и печени животных не превышали 40 Вq/кг. Дозовые нагрузки от внутреннего облучения значительно превосходили дозы внешнего. Следует отметить, что дополнительное действие могли оказывать горячие частицы, учет которых представляет значительные трудности. Контролем служили животные тех же возрастов, содержащиеся в Харьковском виварии. Исследовали физико-химические свойства ДНК, выделенной из печени и селезенки животных. Получение ДНК и ее очистку производили несколькими методами [7, 8]. Примеси белка и РНК не превышали 1 и 3% соответственно. Величина гипохромного эффекта для

Влияние длительного хронического облучения...

полученных образцов высокомолекулярных фракций ДНК контрольных и опытных животных составляла 38-40%. Молекулярную массу (М) ДНК определяли по значениям характеристической вязкости макромолекул $[\eta]$, измеряемой с помощью вискозиметра Зимма-Крозера [9]. Из сравнения молекулярных масс дунитовой и денатурированной ДНК рассчитывали число однонитевых разрывов в макромолекулах, f , [10]. Расчеты величины М производили по эмпирическим уравнениям [11]:

$$[\eta] = 1,05 \cdot 10^{-7} M^{1,32}; M < 2 \cdot 10^6$$

$$[\eta] = 6,9 \cdot 10^{-4} M^{0,7}; 2 \cdot 10^6 < M < 130 \cdot 10^6$$

В модельных экспериментах облучение животных и культуры клеток лимфоцитов проводили так, как это описано в [12, 4]. Микроэлементный состав образцов ДНК анализировали с помощью ядерно-физических методов - резерфордского обратного рассеяния ионов гелия и характеристического рентгеновского излучения, возбуждаемого протонами [13]. Кривые плавления регистрировали на спектрофотометре Specord UV VIS фирмы «Carl Zeiss», Jena, с абсолютной ошибкой в измерении температуры, не превышающей 0,3 °С, ИК-спектры регистрировали на инфракрасном спектрофотометре JR-20, «Carl Zeiss», Jena, с использованием герметических кювет при температуре $t=26^\circ\text{C}$. Тонкие пленки ДНК увлажняли и дейтерировали аналогично тому, как это было сделано в работе [14]. Среднее число молей воды на один моль нуклеотидов ДНК (n) определяли спектрофотометрически по полосам поглощения $\text{H}_2\text{O } \nu = 3400 \text{ см}^{-1}$ и $\text{PO}_2^{2-} \nu = 1224 \text{ см}^{-1}$ с соответствующими коэффициентами поглощения $\epsilon_{3400} = 101 \text{ л/моль}\cdot\text{см}$, $\epsilon_{1224} = 520 \text{ л/моль}\cdot\text{см}$. Определенную степень увлажнения пленок (относительная влажность, О.В., исследованных препаратов составляла 5-96%) получали с помощью набора насыщенных растворов солей. Сравнительный анализ проводили построением зависимостей частот и интенсивностей полос поглощения азотистых оснований и сахарофосфатного остова от числа молекул воды на нуклеотид. Интенсивность полос поглощения измеряли в относительных единицах $R = D/D_0$ где D_i , D_0 -оптические плотности в максимуме поглощения при i -ой и минимальной (5%) О.В. соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В процессе исследований было обнаружено, что ДНК, полученная из тканей чернобыльских животных, состоит из 2-х фракций - высокомолекулярной (ВМ) и низкомолекулярной (НМ) - с молекулярным весом $\sim 10^7$ и 10^5 Да соответственно. Содержание НМ ДНК в первых исследованных поколениях животных составляло $\sim 25\%$ и увеличивалось с возрастом и номером поколения. Как можно видеть (рис. 1) для 12-месячного образца из печени F_6 и 6-месячного F_7

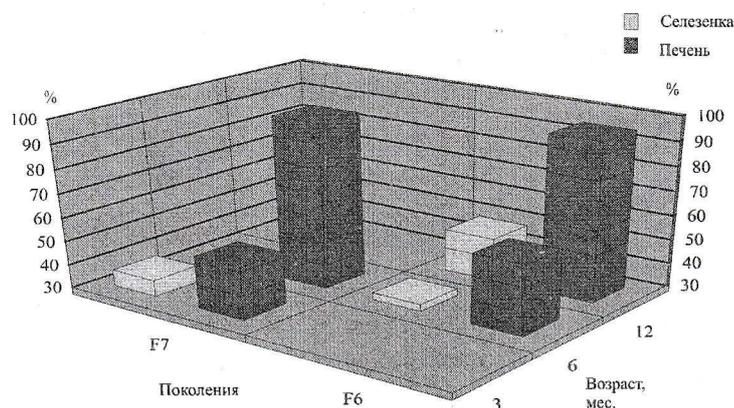


Рис. 1 Содержание НМ ДНК в 7- и 6-м поколениях

почти вся ДНК состоит из НМ-фракции. В то же время в контрольных препаратах как из печени, так и из селезенки содержание НМ фракции не превышало 4-6%. По данным вискозиметрических измерений, молекулярная масса НМ ДНК, лежала в пределах $3 \pm 6 \cdot 10^5$ Да. В отличие от этого, для фракции ВМ ДНК наблюдалось существенное изменение молекулярной массы с возрастом и номером поколения животных разного возраста. Эти данные приведены в таблице 1. Особенно отчетливо это проявляется для ДНК из печени, масса которой изменяется более чем на порядок, что резко отличается от контрольных значений. Приведенные в таблице данные могут быть удобными характеристиками радиационных повреждений генетического аппарата клеток, определяющими возрастными изменениями ДНК и ослаблением процессов репарации в поколениях животных. Дополнительной характеристикой может быть число однонитевых разрывов, число которых для ВМ ДНК составляло 4 на молекулу, а в контроле их количество не превышало $0,3 \pm 0,5$. Увеличение количества НМ ДНК и уменьшение молекулярной массы ВМ ДНК обусловлены, по-видимому, накоплением одно- и дунитевых разрывов в макромолекулах. Этот результат коррелирует с

данными работы [15] по увеличению числа хромосомных aberrаций в ряду поколений животных, постоянно находящихся в зоне ЧАЭС, и результатами исследований [1,2] по

Поколение	Орган	Возраст (мес.)			
		3	6	12	24
F4	П	—	—	1,1	0,11
F5	П	—	—	0,14	—
F6	П	2,5	1,5	0,09*	—
F7	С	—	8,5	2,9	—
	П	0,4	0,08*	—	—
Контроль	С	4,9	43,1	—	—
	П	—	3 - 5,5	—	—
	С	—	4,6 - 6,2	—	—

* - состав всего образца ДНК.

Таблица 1 Изменение молекулярной массы ДНК (ВМ) высоко-молекулярной фракции («средневязкостные») значения $M \cdot 10^7$ Да) из печени (П) и селезенки (С) животных различных возрастных групп (3-24 месяцев) и поколений (F4-F7).

накоплению с возрастом скрытых генетических повреждений в печени животных, подвергавшихся длительному γ -облучению.

Для более полной характеристики обеих фракций были проведены исследования методом электрофореза и пульс-фореза, которые выявили наличие 4-х подфракций в НМ ДНК. Разделение ДНК на несколько фракций и подфракций может быть обусловлено, с одной стороны, стимуляцией некоторых рестриктаз, дающих данный набор фрагментов, что было показано в работах [16], а, с другой, - влиянием радиации на определенные слабые участки молекул.

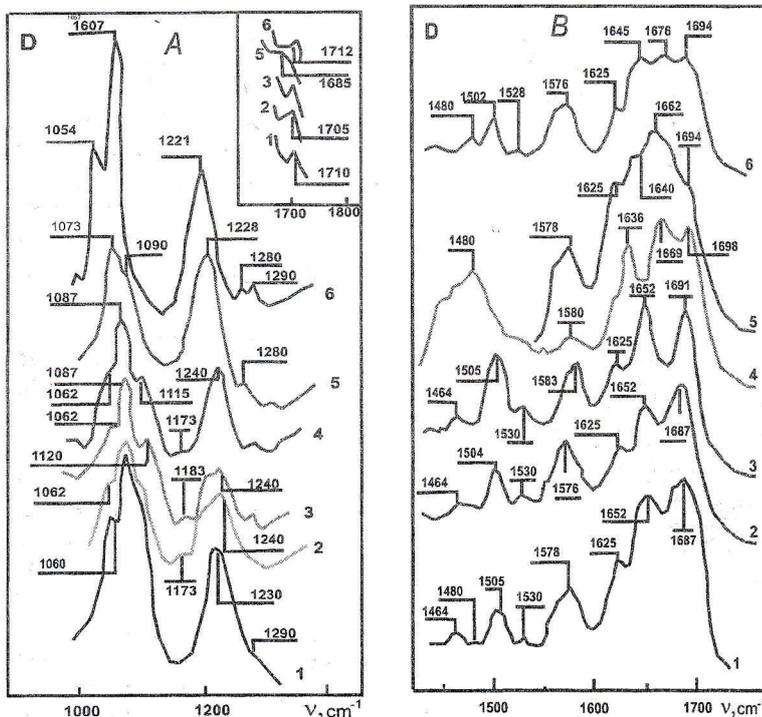


Рисунок. 2. ИК-спектры пленок высокомолекулярной (1) и низкомолекулярной (2) фракций ДНК выделенной из печени 6-месячных подопытных животных шестого поколения; polydG-polydC (3), polydA-polydT (4), денатурированная (5) и нативная (6) ДНК контрольных образцов в H_2O (1000-1300 cm^{-1}) (А) и D_2O (1400-1800 cm^{-1}) (В) для 96% относительной влажности.

Анализ ИК-спектров ВМ ДНК, НМ ДНК, poly dG-poly dC, poly dA-poly dC, денатурированной ДНК и контрольной ДНК (рис. 2) показал, что ВМ ДНК черномыльских животных имеет частичные нарушения во вторичной структуре. Об этом свидетельствуют смещения полосы поглощения рибозы до 1060 cm^{-1} , антисимметричных колебаний фосфатов до 1230 cm^{-1} . Наблюдается ряд отличий в области поглощения азотистых оснований, которые могут свидетельствовать о нарушении в связях, образующих АТ-пары: смещение полосы поглощения $C=O$ колебаний G, T $\nu=1686$ cm^{-1} (нДНК 1766 cm^{-1}), уменьшение интенсивности $C=O$ колебаний T $\nu=1690$ cm^{-1} (нДНК 1694 cm^{-1}), отсутствие полосы $C=N$ А,Т (нДНК 1480 cm^{-1}). Как можно видеть, частоты характеристических полос поглощения НМ ДНК существенно отличаются от полос поглощения денатурированной ДНК и poly dA-poly dT. При этом наблюдается согласование со спектром poly dG-poly dC. О нарушении структуры НМ ДНК свидетельствует также смещение частот характеристических полос поглощения сахарофосфатного остова к значениям, характерным для разупорядоченного состояния макромолекул: 1240 cm^{-1} (антисимметричные колебания фосфатов), 1060 cm^{-1} (рибоза). О нарушении структуры НМ ДНК

свидетельствует также отсутствие гипохромного эффекта, который для нативной ДНК наблюдается в области поглощения азотистых оснований при относительной влажности 64-76%, когда формируется 2-спиральная структура биополимера (рис. 3.). Таким образом можно заключить, что НМ ДНК находится в частично денатурированном состоянии и обогащена GC-парами.

Результаты, полученные методом термической денатурации подтверждают эти данные [13]. Так в отличие от контрольных образцов, характеризующихся S-образной кривой плавления, ДНК, выделенная из тканей черновыльских животных, имеет в случае ВМ ДНК 2-ступенчатую кривую плавления, или в случае НМ ДНК, характеризуется непрерывным изменением гиперхромизма (h) во всем интервале плавления при пониженном его значении: $h \sim 15\%$. Причиной этого является наличие нескольких подфракций, которые имеют свою температуру плавления и частично

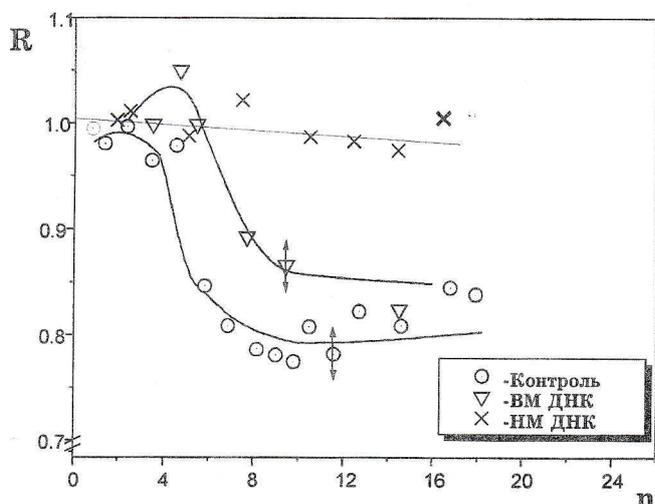


Рисунок 3. Зависимость интенсивности (R) от числа сорбированных молекул воды на нуклеотид для полосы поглощения C=N группы гуанина в спектре ВМ ДНК, НМ ДНК и ДНК из тканей контрольных животных.

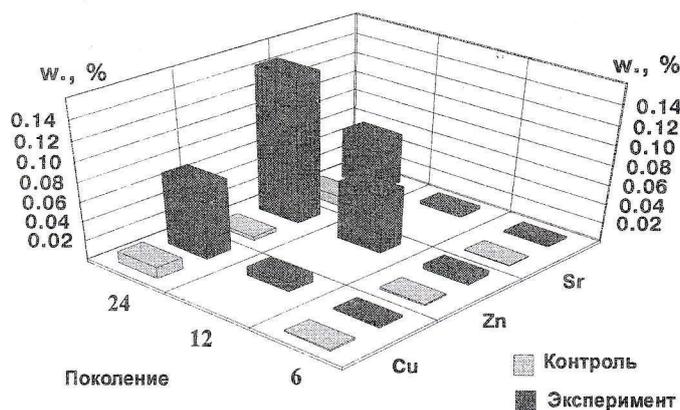


Рис. 4. Изменение содержания металлов в образцах ДНК.

разрушены, что ведет к размытию всего интервала плавления, а для ВМ ДНК - смешению НМ и ВМ ДНК, дающих две ступени перехода. При этом первая ступень также размыта, что отражает неоднородность ее молекулярной массы и нарушение двойной спирали.

Существенные изменения наблюдаются и в микроэлементном составе образцов ДНК, полученных из тканей черновыльских животных. Данные, полученные с помощью ядерно-физических методов исследования [13], свидетельствуют о существенно большем содержании в опытных образцах ДНК: Zn - ~ в 40 раз, Se - ~ в 60 раз, Fe - ~ в 24 раза, Cu, Sr ~ в 5 раз, Cd. (рис. 4).

Избыточное содержание металлов может свидетельствовать о нарушении ионного обмена и злокачественном перерождении в тканях животных, подвергнутых длительному облучению в черновыльской зоне. Такое перерождение тканей действительно наблюдалось у черновыльских животных [15]. Корреляция между злокачественным перерождением и накоплением металлов в клетках обнаружена в работах [17]. Известно также, что ионы металлов способны усиливать действие радиации на

при высоких концентрациях эти ионы оказывают дестабилизирующее действие, способны разрушать структуру ДНК, вызывая ее денатурацию при комнатных температурах [3].

Для выяснения механизмов фрагментации ДНК и возникновения большого количества НМ ДНК у чернобыльских животных нами были проведены эксперименты с длительным облучением животных [12]. Были изучены свойства ДНК, полученной из печени крыс линии Вистар разных возрастных групп, подвергавшихся γ -облучению в суммарной дозе 13 Гр (суточная доза 0,6 Гр) в течение 22 суток в условиях вивария и затем подвергнутых гепатектомии. Поскольку клетки печени обладают низкой пролиферативной активностью после облучения, эта операция была необходима для стимуляции клеток к делению, в процессе которого могут обнаруживаться дефекты ДНК, накопленные за время облучения. В результате этого эксперимента было обнаружено большее количество НМ ДНК достигающее 65% для 9-месячных животных. В селезенке облученных животных количество НМ ДНК составило 41%. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что в процессе облучения животных могут накапливаться скрытые повреждения генома, которые проявляются после процедуры

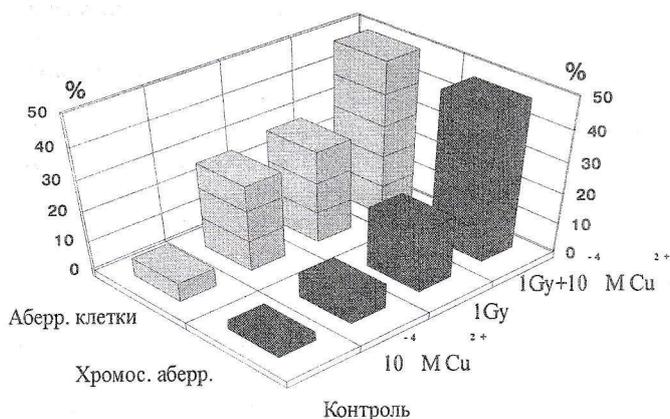


Рис. 5. Возрастание хромосомных aberrаций в облученных лимфоцитах в присутствии ионов меди.

процедуры гепатектомии и о наличии которых может свидетельствовать НМ ДНК. Представляло интерес исследование совместного действия ионов Cu^{2+} , Zn^{2+} и облучения в условиях Чернобыльской зоны на структуру ДНК животных. В этом эксперименте самцы белых беспородных крыс получали с 2-месячного возраста в 5 раз большее количество меди и цинка (в виде сульфата меди и хлорида цинка) с пищей на протяжении 4 месяцев. Результаты эксперимента представлены в таблицах 2 и 3.

Место содержания животных	Фракция	Возраст	Печень		Селезенка	
			$M_n \cdot 10^{-7}$, Да	f, повр./мол.	$M_n \cdot 10^{-7}$, Да	f, повр./мол.
Харьков	ВМ	4	5,5	0,0	4,8	0,4
		4*	4,8	1,0	2,9	2,3
ЧАЭС	ВМ	4	2,7	0,0	6,0	0,8
		4*	0,17	2,5	0,17	3,4
		6	4,5	1,8	7,7	2,4
	НМ	6*	2,6	4,4	6,7	2,5
		4	0,17	0,7	-	-
		4*	0,036	2,3	-	-
	6	0,077	0,0	-	-	
	6*	0,19	1,0	-	-	

M_n -- молекулярная масса нативной ДНК, * -- животные получавшие пищу с добавками меди.

Таблица 2. Изменение молекулярных параметров ДНК, выделенной из печени и селезенки крыс, которые потребляли медь.

Влияние длительного хронического облучения...

Место содержания животных	Фракция	Возраст	Печень		Селезенка	
			$M_n \cdot 10^{-7}$, Да	f, повр./мол.	$M_n \cdot 10^{-7}$, Да	f, повр./мол.
Харьков	ВМ	4	3,2	0,0	2,6	0,0
		4*	6,4	0,0	1,9	0,4
ЧАЭС	ВМ	4	21	1,4	4,0	2,1
		4*	13	1,5	3,8	0,2
		6	16	2,4	3,7	0,4
		6*	3	0,0	4,3	0,8
	НМ	6	0,5	1,4	-	-
		6*	0,5	4,4	-	-

M_n -- молекулярная масса нативной ДНК, * -- животные получавшие пищу с добавками цинка.

Таблица 3. Изменение молекулярных параметров ДНК, выделенной из печени и селезенки крыс, которые потребляли цинк

Как можно видеть совместное действие ионов Cu^{2+} и облучения вызывает возрастание примерно в 4 раза одонитевых разрывов ВМ ДНК в печени 6-месячных животных и примерно в 2,5 раза у 4-месячных [12]. В макромолекулах ДНК из селезенки количество одонитевых разрывов увеличивалось в 1,5 раза по сравнению с контролем. При этом значительно увеличился выход одонитевых разрывов в ДНК животных, которые получали Cu^{2+} в отсутствие облучения.

Полученные результаты можно объяснить тем фактом, что ионы Cu^{2+} имеют высокую константу связывания с ДНК, особенно с основаниями, сильно изменяют структуру ДНК при связывании, вызывая ее дестабилизацию [3] вследствие чего могут усиливать действие радиации. В случае Zn наблюдались меньшие эффекты, что коррелирует с его константами связывания с ДНК и может быть также обусловлено иммуномодуляторными свойствами цинка [12].

На основании полученных результатов можно предложить модель повреждений ДНК в условиях действия радионуклидов и ионов металлов [6] (рис. 9). У черномыльских животных повреждения ДНК могут быть особенно значительными вследствие связывания, наряду с Me^{2+} и ионов радионуклидов (Am^{n+} , Pu^{n+}) с линкерными участками нуклеосом, свободными от гистонов, что ведет к ионизации окружения, возникновению радикалов и появлению одно- и двунитевых нерепарируемых повреждений с последующим выходом НМ фракции ДНК в процессе ее выделения.

Также следует отметить, что наблюдаемые сильные повреждения ДНК могут являться следствием апоптоза [18] и для окончательного выяснения механизмов наблюдаемых явлений, особенно это касается накопления повреждений ДНК в ряду поколений животных, требуются дальнейшие исследования.

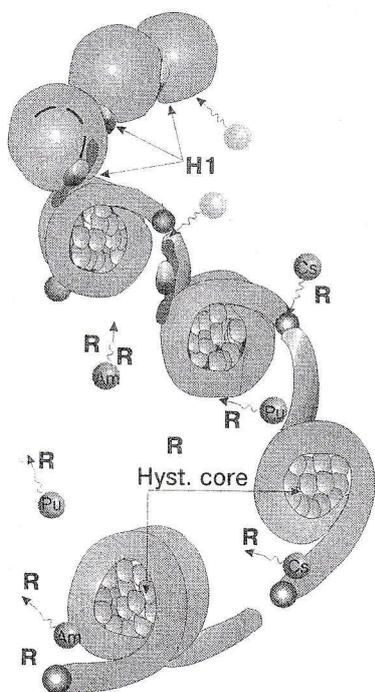


Рисунок 9. Схема повреждения ДНК при действии ионов металлов и радиации

ВЫВОДЫ

1. Воздействие хронического облучения на белых беспородных крыс, постоянно живущих в Чернобыльской зоне, приводит к деградации их ДНК. Появляется НМ фракции ДНК. Ее содержание увеличивается с возрастом и увеличением номера поколения животных.
2. Низкомолекулярная фракция ДНК обогащена ГЦ-парами и состоит из 4 подфракций: а) ~500 пар нуклеотидов, б) ~1500-200 п.н. в) ~4000-5000 п.н., г) смесь с 20000 п.н.
3. В ДНК животных, постоянно живущих в зоне, резко увеличивается содержание различных микроэлементов: Zn - ~ в 40 раз, Se - ~ в 60 раз, Cu, Fe - ~ в 6-7 раз по сравнению с контролем.
4. Добавление Cu в пищу животных, постоянно проживающих в зоне, усиливает влияние радиации. Модельные эксперименты при комбинированном воздействии облучения и ионов Cu на ДНК из лимфоцитов крови обнаружили синергизм их действия.
5. В сравнении с ионами меди цинк оказывает меньшее воздействие на физико-химические свойства ДНК

6. Результаты экспериментов по изучению свойств ДНК из регенерировавших клеток печени после операции гепатектомии у длительно облученных животных подтверждают увеличение замаскированных повреждений ДНК в результате облучения, что проявляется в появлении НМ фракции ДНК, количество которой достигает 65%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Misurova E., Krivanova M., Kropachova K., Fabianova B. // Radiobiol. Radiother. 1987. 28, №1. P. 59-68.
2. Кропачова К., Мишурова Е. // Бюл. экспе-рим. биологии и медицины. 1981. № 3. С. 359-361.
3. Благой Ю.П., Галкин В.Я., Гладченко Г.О., Корнилова С.В., Сорокин В.А., Шкорбатов А.Г. Металлокомплексы нуклеиновых кислот в растворах. Киев: Наук. думка, 1991. 272 с.
4. Kornilova S. V., Blagoi Yu. P., Moskalenko I. P. et al. // Studia biophysica. 1988. 123, N 2. P. 77-84.
5. George A. M., Sabovliyev S. A., Cramp W. A. // Int. J. Radiat. Biol. 1986. 50, N 5. P. 927.
6. Kornilova S.V., Kapinos L. E., Leontiev V. S., Grigoriev D. N., Blagoi Yu.P. // Physica Medica. 1997. V.13. S.1. P. 280-281.
7. Marmur J., Rownd R., Schildkrmant C. // Progr. Nucleic Acids Res. 1963. V.7. P.232.
8. Kay E.R., Simmons N.S., Dounce N.L.J. // J. Amer. Chem. Soc. 1952. V.74. P.1724.
9. Благой Ю.П., Корнилова С.В., Сохан В.И. // Мол. биология. 1992. Т.16, №1. С.210.
10. Рябченко Н. И., Голубева Р. В., Иваннык Б. П. // Радиобиология, 1973. 15. №2. С. 171-174.
11. Eigner J., Doty P. // J. Mol. Biol. 1965. V.12. P.549.
12. Ю.П.Благой, Д.М.Григор'ев, В.М.Индик, С.В.Корнилова, К.Кропачова, В.С.Леонтьев, Е.Мишурова, Я.І.Серкіз. // Доповіді Нац. Акад. наук України. 1996. С. 110-112.
13. Благой Ю.П., Корнилова С.В., Леонтьев В.С., Сорокин В.А., Гладченко Г.О., Валеев В.А., Григорьев Д.Н., Капинос Л.Е., Бондаренко В.Н., Колод В.Я. // Биофизика. 1994. 39, вып. 4. С. 637-645.
14. Semenov M. A., Sukhorukov V. I., Maleev V. Ya. // Biophysika. 1981. 26. P. 979.
15. Индык В.М., Парновская Н.В., Серкиз Я.Н. и др. П // Радиобиология. 1991. Т.31. С.663.
16. Хансон К.П., Комар В. Е. Молекулярные механизмы • радиационной гибели клеток. М.: Энергоатомиздат, 1985. 141 с.
17. Андроникашвили Э.Л. // Биофизика. 1987. Т.32, вып.5. С.728.
18. Бычковская И.Б., Комаров Е.Н. // Радиобиология. 1990. Т.30, вып.4. С.467.