

2/1/18
ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

P19-84-286

И.Л.Липидус, В.М.Назаров, Г.Эригребер

ВОЗДЕЙСТВИЕ γ -ИЗЛУЧЕНИЯ И НЕЙТРОНОВ
НА ДНК-МЕМБРАННЫЕ КОМПЛЕКСЫ
КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Направлено в журнал "Радиобиология"

1984

В ряде работ последних лет указывалось на то, что существенная роль в хранении и реализации генетической информации принадлежит не только нуклеотидной последовательности ДНК, но и высшей суперспиральной форме ее организации в субъединицах /или доменах/ в клеточном ядре/1-4/. Одним из методов изучения суперспирального состояния ДНК является определение скорости седиментации высвобожденных с помощью щадящего лизиса клеток так называемых ДНК-мембранных комплексов /ДМК/. При воздействии редкоизирующих излучений в дозах примерно до 10 Гр относительная скорость седиментации /ОСС/ ДМК изменяется вследствие возникновения одностебельных разрывов /ОР/ ДНК, что позволяет определить молекулярный вес ДМК/2,5,6/. Недавно нам удалось показать/7/, что при γ -облучении в дозах свыше 50 Гр ДМК также седиментируют характерным образом. Мы выдвинули гипотезу о том, что причиной этого является повышение числа двустебельных разрывов /ДР/ ДНК. При введении молекулярного веса ДМК такой метод был бы пригоден для определения выхода ДР ДНК.

Экспериментальным подтверждением гипотезы могло бы служить исследование седиментационного поведения ДМК после воздействия ионизирующего излучения другого качества, вследствие чего изменяются доли ОР и ДР ДНК.

Данные о воздействии плотноионизирующих излучений на ДМК в литературе крайне ограничены и касаются только малых доз излучений/8/. Поэтому нами были запланированы эксперименты такого рода с нейтронами на установке ИБР-2 /ЛНФ ОИЯИ/ и тяжелыми ионами на ускорителе У-200 /ЛЯР ОИЯИ/.

Целью настоящей работы явилась попытка охарактеризовать седиментационное поведение ДМК клеток китайского хомячка линии V79-4 при их облучении нейтронами на биофизическом канале установки ИБР-2 и сопоставление этих данных с результатами γ -облучения тех же самых клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клетки. Объектом исследований служили клетки китайского хомячка линии V79-4, методы культивирования, обработки и седиментационного анализа которых подробно описаны в/9/.

Облучение. Условия γ -облучения подробно описаны в/7/. Облучение суспензии клеток нейтронами проводилось на импульсном реакторе на быстрых нейтронах ИБР-2/10/. В отличие от стационарных

источников, в которых нейтроны и гамма-кванты излучаются непрерывно, в реакторах типа ИБР эти виды излучений генерируются в виде периодических импульсов. На ИБР-2 полуширина импульсов по быстрым нейтронам составляет 250 мкс, и форма импульсов близка к гауссовой. Конструкция реактора позволяет генерировать импульсы с частотой 5 и 25 Гц. Между ними существует незначительный фон, уровень которого в 20000 раз меньше, чем амплитуда основного импульса. При работе на частоте 5 Гц между основными импульсами располагаются 4 побочных импульса-"сателлита", амплитуда которых составляет всего 0,04% от основного.

Поскольку ИБР-2 в основном используется для исследований в области физики конденсированных сред, когда необходимы только тепловые и надтепловые нейтроны, то для их генерации у активной зоны реактора установлены водяные замедлители со средней толщиной по воде 5-6 см. Поэтому спектр нейтронов в пучках обогащен тепловыми и надтепловыми нейтронами. Аналогично ИБР-30/11/ спектр нейтронов для энергий выше 0,5 мэВ по форме близок к спектру деления со средней энергией по потоку около 1,5 мэВ, а за счет надтепловых нейтронов средняя энергия всего спектра снижается в 2 раза.

Для радиобиологических исследований ИБР-2 оборудован специализированным биофизическим каналом /БФК/. В его экспериментальный павильон пучок нейтронов выводится через сменный коллиматор, позволяющий дистанционно и за короткое время /15-20 с/ выбрать любой из коллиматоров, а при установке в нейтральное положение за 10 с перекрывает пучок.

Выходное окно коллиматора находится на расстоянии 750 см от центра активной зоны реактора. Сменный коллиматор позволяет формировать пучки со стационарным сечением 15x20 см², 10x10 см², 5x5 см² и вращающийся коллиматор /5x5 см²/. Меньшие сечения и иные формы коллиматоров строятся из указанных стационарных.

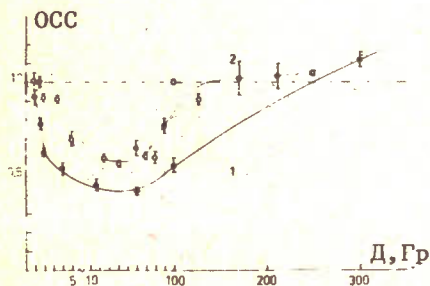
Для измерения спектра нейтронов и уменьшения вклада в нейтронную дозу гамма-лучей БФК оборудован фильтрами, требуемая композиция которых устанавливается дистанционно в течение 1-3 мин.

В экспериментах, обсуждаемых в этой работе, облучение суспензии клеток в полиалюминиевых пробирках проводилось без фильтров с коллиматором 15x20 см² при температуре 40°C. Неравномерность нейтронного поля в месте установки образцов была не хуже 3-5%. Средняя мощность дозы нейтронов при мощности реактора 1 мВт при частоте 5 Гц составляла 0,55-0,6 Гр/мин при вкладе гамма-лучей в нейтронную дозу 10-15%. Измерение мощности дозы излучения от нейтронов осуществлялось ионизационными камерами и кремниевыми детекторами с полиэтиленовыми конверторами, а от гамма-лучей - ионизационными камерами с алюминиевыми стенками. Градуировка используемых дозиметров была проведена на биофизическом канале реактора ИБР-30, на котором осуществлено сличение методов метрологии нейтронных пучков/12/, т.е. пучок ИБР-30 использовался в качестве стандартного.

Набор экспозиционных доз в процессе облучения осуществлялся по ионизационной камере объемом 1 см³ "клинического дозиметра" /ГДР/ и по кремниевому детектору с полиэтиленовым конвертором. Дополнительный контроль проводился по времени облучения и по счету числа импульсов реактора. При облучении суспензии клеток в кюветах диаметром 10 мм экстинкция нейтронного пучка по дозе не превышала 5% и в представляемых зависимостях доза-эффект не учитывалась.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами обнаружено аномальное /с точки зрения существовавших представлений/ поведение ДМК в области доз гамма-облучения порядка 100 Гр/7/. Изучив поведение ДМК при облучении клеток гамма-лучами в дозах до 3000 Гр, мы получили зависимость ОСС ДМК от дозы облучения, начальный участок которой представлен на рисунке кривой 1. Сравнив эту кривую с собственными и расчетными данными о доле ДНК/13/, высвобождаемой в результате гамма-облучения клеток, мы пришли к следующему заключению. В области доз облучения до 5 Гр отмечаемое седиментационное поведение ДМК является следствием деспирализации суперспиральных субъединиц ДНК в результате образования ОР, что приводит к уменьшению скорости седиментации. При дозах порядка 50 Гр все комплексы деспирализованы, и скорость седиментации минимальна. Доля высвобождаемой ДНК при этом составляет около 3% и на седиментацию комплексов повлиять не может /нами проведены исследования, показавшие, что все ДНК-содержащие компоненты седиментируют в виде единого агрегата со скоростью, зависящей от доли каждого компонента в смеси/7%. В области доз от 50 до 550 Гр ОСС быстро возрастает за счет компактизации комплексов вследствие значительного высвобождения ДНК /67%. Если справедливо наше представление о том, что в указанной области доз /выше 50 Гр/ определяющим фактором в седиментационном поведении ДМК является повышение числа ДР ДНК, для нейтронов можно ожидать следующего результата: так как известно, что выход ДР для плотноионизирующих излучений увеличивается с ростом ЛПЗ/14/,



Зависимость относительной скорости седиментации ДМК от дозы облучения гамма-лучами /кривая 1/ и нейтронами /кривая 2/. По оси абсцисс - доза в Гр, по оси ординат - ОСС ДМК в относительных единицах

кривая зависимости ОСС от дозы нейтронов должна начать возрастать при меньших дозах, чем в случае гамма-излучения.

В связи с этим нами была предпринята попытка оценить зависимость ОСС ДМК от дозы облучения нейтронами на БФК ИБР-2. Результаты представлены в виде кривой 2 на рисунке. Как видно, на этой кривой можно выделить те же участки, что и при рассмотрении кривой 1. Легко заметить, что при дозах облучения менее 5 Гр падение скорости седиментации, обусловленное возникновением ОР ДНК, происходит значительно медленнее, чем в случае гамма-лучей, чего и следовало ожидать для более плотноионизирующего излучения. Очевидно, процесс деспирализации суперспиральных субъединиц ДНК в какой-то мере компенсируется образованием ДР, что приводит к несколько более высокому уровню плато в области доз нейтронов от 5 до 80 Гр по сравнению с гамма-излучением. Дальнейшая /при дозах выше 80 Гр/ фрагментация ДНК приводит к компактизации комплексов и соответствующему возрастанию ОСС. Этот процесс начинается раньше и происходит быстрее, чем в случае гамма-излучения. Так, величина ОСС достигает значения 1 для гамма-лучей при дозе ~300 Гр, а в случае нейтронов - уже при дозе ~100 Гр. Отсюда можно заключить, что именно ДР ДНК ответственны за возрастание ОСС в области больших доз облучения. Предполагаемые в ближайшем будущем расчеты выхода ДР ДНК по кривой зависимости ОСС от дозы облучения позволят сделать точные выводы, но и качественная оценка хода кривых дает возможность заключить, что ОБЭ использованных нейтронов по критерию образования ДР ДНК равна примерно 2,5-3.

Таким образом, приведенные выше рассуждения позволяют сделать вывод о том, что характер зависимостей ОСС ДМК при гамма- и нейтронном облучении качественно одинаков, однако наблюдаются количественные различия, успешно объясняемые физической природой воздействующих факторов.

Авторы признательны А.Круг и М.Лаукнер за техническую помощь в проведении экспериментов, В.П.Сысоеву - за помощь в работе на БФК ИБР-2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cook P.R. Biol.Rev., 1974, vol.49, p.51-84.
2. Cook P.R., Brazell J.A. J.Cell Science, 1975, vol.19, p.261-279.
3. Hartwig M. Acta biol. and med.germ., 1978, vol.37, p.421-432.
4. Hartwig M. Int.J.Rad.Biol., 1980, vol.37, p.569-571.
5. Абель Х., Эрцгребер Г. Радиобиология, 1983, XXIII, 1, с.14-20.

6. Filippovich I.V. et al. Int.J.Rad.Biol., 1982, vol.42, No.1, p.31-44.
7. Erzgräber G., Lapidus I.L., Abel H. JINR, E19-83-493, Dubna, 1983.
8. Fender H. Sedimentationsuntersuchungen an chromosomaler Säuger-DNS. Dissertation Adw, DDR, 1979.
9. Абель Х., Эрцгребер Г., Лангрок К. ОИЯИ, 19-82-379, Дубна, 1982.
10. Ананьев В.Д. ПТЭ, 1977, 5, с.17.
11. Комова О.В., Назаров В.М., Стойка М. ОИЯИ, P18-12147, Дубна, 1979.
12. Капчигашев С.П. и др. Мед.радиол., 1983, 2, с.65-72.
13. Эрцгребер Г., Лapidus И.Л., Айхорн К. ОИЯИ, 19-83-491, Дубна, 1983.
14. Günter K., Schulz W. In: Biophysical Theory of Radiation Actions. A Triatise of Relative Biology Effectivness. Academie Verlag, Berlin, 1982.

Рукопись поступила в издательский отдел
27 апреля 1984 года.

Лapidus И.Л., Назаров В.М., Эрцгребер Г. P19-84-286
Воздействие γ -излучения и нейтронов
на ДНК-мембранные комплексы клеток млекопитающих

Представлены первые результаты радиобиологических исследований на биофизическом канале реактора ИБР-2 ОИЯИ. Изучалось седиментационное поведение ДНК-мембранных комплексов при облучении клеток китайского хомячка V79-4 в широком диапазоне доз γ -излучения и нейтронов. Подтверждено высказанное авторами ранее предположение о роли двунитевых разрывов ДНК в изменении относительной скорости седиментации комплексов при облучении клеток в дозах выше 50 Гр.

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1984

Перевод М.Потапова

Lapidus I.L., Nazarov V.M., Erzgräber G. P19-84-286
Gamma-Irradiation and Neutron Effect
on DNA-Membrane Complexes of Mammalian Cells

The first results of radiobiological investigations in the biophysical channel of the JINR reactor IBR-2 are presented. Sedimentation behaviour of DNA-membrane complexes has been studied at irradiation of the Chinese hamster cells (V79-4) in a wide dose range of ^{137}Cs γ -irradiation and neutrons. An earlier assumption of the authors on the role of DNA double-strand breaks in changing the relative sedimentation velocity of complexed at irradiation of cells with doses over 50 Gy has been confirmed.

The investigation has been performed at the Laboratory of Neutron Physics, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1984