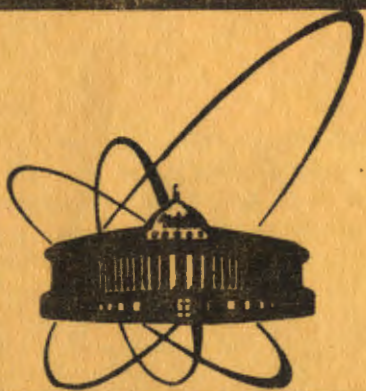


86-853



**сообщения
объединенного
института
ядерных
исследований
дубна**

P19-86-853 e +

Э.Гацек, Э.Н.Исмаилова, И.Н.Кузовкина*,
В.М.Назаров, М.Г.Ширинская*

**ВЛИЯНИЕ НЕЙТРОННОГО ОБЛУЧЕНИЯ
НА РОСТ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ
РУТЫ ДУШИСТОЙ
И СОДЕРЖАНИЕ В НЕЙ РУТАКРИДОНА**

*Институт физиологии растений АН СССР, Москва

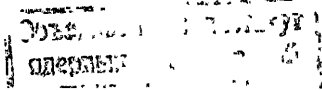
1986

В последние годы внимание исследователей привлекают культуры растительных тканей продуцентов, способных в условиях *in vitro* сохранять биосинтез вторичных веществ на уровне целого растения или синтезирующего в условиях культуры значительно большее количество природных веществ, чем органы интактного растения. Особый интерес привлекают ткани, метаболиты которых применяются в фармакологии и медицине^{/1,2/}. К их числу относится штамм R-20 руты душистой - ткань, синтезирующая в культуре акридоновый алкалоид рутакиридон. В ряде работ последних лет указывалось на то, что уровень синтеза вторичных метаболитов может изменяться под влиянием различных факторов химической /состав питательных сред, содержание растительных гормонов и т.д./ и физической /УФ-, γ -облучение/ природы^{/3/}. Было также обнаружено, что ионизирующее излучение, с одной стороны, повышает концентрацию биологически активных веществ, с другой - вызывает различные аномалии роста и развития^{/4/}. Однако в экспериментах, проведенных ранее на штамме каллусной ткани руты душистой с γ -лучами была показана высокая радиостойчивость ткани, причем облучение практически не изменяло биосинтетической активности ткани^{/9/}. В этой связи представляется интересным проведение исследований реакций растительной ткани руты душистой на действие излучений, обладающих высокой биологической эффективностью. К таким излучениям относятся быстрые нейтроны.

Задачей настоящей работы явилось исследование реакций изолированной растительной ткани руты душистой на действие быстрых нейтронов и влияние нейтронного облучения на синтез вторичных метаболитов, а именно: алкалоида рутакиридона /аналог рутакиридона акроницин обладает активным антиканцерогенным действием/^{/5/}. С этой целью нами проведено исследование реакций доза-эффект по следующим параметрам ткани: ростовой индекс, отражающий ростовую активность ткани, концентрация алкалоида рутакиридона и "выход" рутакиридона в двух штаммах R-20 и R-15 руты душистой, различающихся по своей биосинтетической активности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа проводилась со штаммом каллусной ткани *Ruta graveolens* R-20, синтезирующим алкалоид рутакиридон, полученным от штамма R-19 и отличающимся от него способностью расти на питательной среде, не содержащей ростовые вещества, и также с гормонозависимым штаммом R-15, не продуцирующим акридоновый алкалоид рутакиридон. Ткани выращивались на среде Мурасиге и Скуга при $t -26^{\circ}$



и относительной влажности 70%/6/. Облучение предварительно взвешенной ткани проводили в конце первой недели ее роста, то есть в период экспоненциальной фазы роста. При облучении использовали полиэтиленовые контейнеры без питательной среды. Методика облучения описана в работе/7/. После облучения ткань помещали вновь на питательную среду и продолжали выращивать ее в обычных условиях. В конце пассажа на 28 сутки ткань взвешивали и определяли ее ростовой индекс /РИ/, который служил показателем ростовой активности клеток ткани. Эти же образцы затем фиксировали кипящим этиловым спиртом и экстрагировали из них алкалоид рутакридон.

Содержание алкалоида определяли в спиртовом растворе на регистрирующем спектрофотометре "Specord UV-Vis" (Karl Zeiss, Jena) при длине волны 401 нм. Коэффициент удельного поглощения рутакридона составляет 190 /при 401 нм/. Концентрация рутакридона в образцах ткани дается в миллиграммах на 1 г сырого веса ткани. Для оценки комплексного влияния нейтронного облучения на рост ткани и биосинтез алкалоида использован показатель "выхода" рутакридона, представляющий собой произведение концентрации алкалоида на ростовой индекс. Опыты проводились семикратно.

Биофизический канал /БФК/ ИБР-2 имеет три позиции для облучения образцов/8/. В первую позицию образцы доставлялись сжатым воздухом в полиэтиленовых транспортных контейнерах "Регата". Мощность дозы облучения образцов в этой позиции составляла 2,5, 5 и 10 Гр/с. Во второй позиции мощность дозы - 0,3 Гр/с, в третьей - 0,01 Гр/с. Облучение проводили дозами: в позиции № 1 - 10-160 Гр; в позиции № 2 - 10-400 Гр; в позиции № 3 - 0,3-20 Гр.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис.1 представлены результаты облучения ткани быстрыми нейтронами штамма R-20 по критерию изменения ростового индекса, концентрации алкалоида рутакридона и "выхода" рутакридона. Кри-

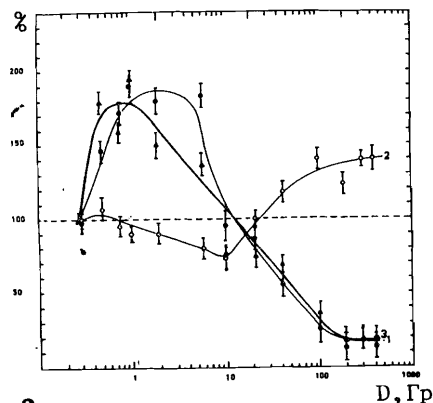


Рис.1. Изменение ростового индекса /кривая 1 - • /, концентрации рутакридона /кривая 2 - о/, "выхода" рутакридона /кривая 3 - Δ/ руты душистой штамма R-20 при действии на нее нейтронного облучения. По оси абсцисс - дозы облучения, Гр; по оси ординат - ростовой индекс /1/, концентрация рутакридона /2/ и "выход" рутакридона /3/, в % от контроля.

вая 1 отражает ростовую активность ткани. Как видно, нейтронное облучение в дозах 0,3-5 Гр вызывает достоверную стимуляцию роста ткани. Дозы, превышающие 50 Гр, обладают сильно выраженным ингибирующим рост действием, и в диапазоне доз 100-400 Гр наблюдается подавление роста ткани практически до 15% по сравнению с контрольным образцом. Кривая 2 - результаты определения концентрации алкалоида рутакридона в образцах. Из рис.1 видно, что в области стимулирующих доз /0,3-5 Гр/ содержание рутакридона близко к контрольному, далее, с увеличением доз до 10 Гр, концентрация алкалоида снижается приблизительно на 20% по отношению к контрольному /кривая 2/. Дальнейшее ингибирование роста ткани при действии нейтронами сопровождалось увеличением концентрации в клетках ткани алкалоида рутакридона. Дозы свыше 50 Гр вызывали увеличение концентрации алкалоида до 140%. Кривая 3 отражает "выход" алкалоида в облученной ткани к концу пассажа. Эта величина зависит не только от концентрации алкалоида в клетках, но и от интенсивности роста клеток ткани /РИ/. Как видно из рис.1, "выход" алкалоида в диапазоне доз 0,4-2 Гр увеличивается на 150-180% по сравнению с контролем. Дальнейшее увеличение доз облучений приводит к накоплению в ткани алкалоида при одновременном резком снижении ростового индекса и "выхода" рутакридона. Обратная корреляция между ростом клеток и накоплением в них вторичных метаболитов - явление, установленное как при изучении динамики роста клеток, так и при действии различных факторов, тормозящих их рост/10,11/. Полученные нами данные по изменению ростовой активности клеток и биосинтеза рутакридона отличаются от более ранней работы/9/, сделанной при γ -облучении, в случае которого даже использование таких больших доз, как 1500 Гр, не приводило к 50-процентному подавлению роста ткани.

С целью выяснения отдаленных эффектов действия нейтронного облучения на регенерационную способность растительной каллусной ткани штамма R-20 нами были исследованы эти же параметры при повторном пересеве ткани после облучения. Результаты представлены на рис.2. Как видно из данных рис.2, в первом пассаже /а/,

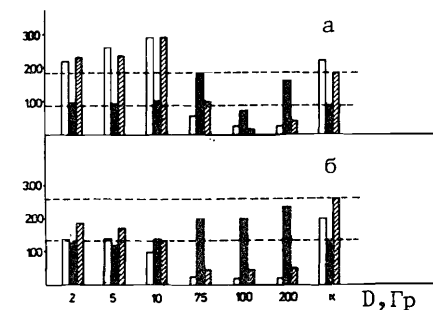


Рис.2. Сравнение роста каллусов, концентрации и "выхода" рутакридона штамма R-20 в двух последующих пассажах: график а - первый пассаж /28-е сутки после облучения/, график б - второй пассаж /56-е сутки после облучения/. По оси абсцисс: дозы облучения, Гр; по оси ординат: □ - рост каллусов в граммах на грамм инокулята; ■ - концентрация рутакридона в миллиграммах на грамм сырого веса; ▣ - выход рутакридона в конце пассажа в миллиграммах на грамм.

то есть непосредственно после облучения, в диапазоне низких доз наблюдается увеличение ростового индекса и "выхода" рутакридона, а в диапазоне высоких доз - снижение ростового индекса и "выхода" рутакридона одновременно с увеличением концентрации рутакридона, что согласуется с опытом, представленным на рис.1. Имеющиеся некоторые различия в абсолютных значениях могут быть связаны с проведением опытов в разное время года. Что касается второго пассажа ткани /6/, то здесь проявилось подавление ростовой активности синтеза рутакридона как в диапазоне малых, так и больших доз.

Из представленных результатов действия нейтронного облучения на растительные клетки можно сделать вывод об ограниченном стимулирующем эффекте по критериям ростового индекса и "выхода" рутакридона и проявлении отдаленного действия облучения во втором пассаже. Обработка в этом же возрасте клеток штамма R-15, для которого не характерен биосинтез акридинового алкалоида рутакридона, показала значительно большую чувствительность этого штамма к нейтронному облучению по критерию ростового индекса. Как видно из рис.3, доза в 2 Гр ингибировала рост ткани на 50% по сравнению с контролем. Интересно отметить, что подобные дозы для штамма R-20 вызвали значительную стимуляцию роста ткани /рис.1/. Для штамма R-15 увеличение ростовой активности вызывали дозы в пределах 0,8-1 Гр. Наши опыты на штамме R-15 подтвердили обнаруженную ранее при γ -облучении реакцию большей чувствительности к облучению штамма R-15 по сравнению со штаммом-продуцентом /9/. Причина столь высокой радиорезистентности штамма R-20 пока неясна, но можно предположить, что рутакридон является радиопротектором для штамма-продуцента. На рис.4 представлены данные по изменению концентрации алкалоида рутакридона в штамме R-20, облученном на установке "Регата" с разной мощностью доз: 2,5, 5 и 10 Гр/с /кривые 2,3,4/. Кривая 1 отражает данные облучений в позиции 2, где мощность дозы соответствовала 0,3 Гр/с. Облучение проводили дозами 10, 20, 40, 80, 160 Гр. Обработка высокими мощностями доз ингибировала рост растительной ткани и вызывала увеличение концентрации алкалоида рутакридона в среднем на 180-200%, а в отдельных слу-

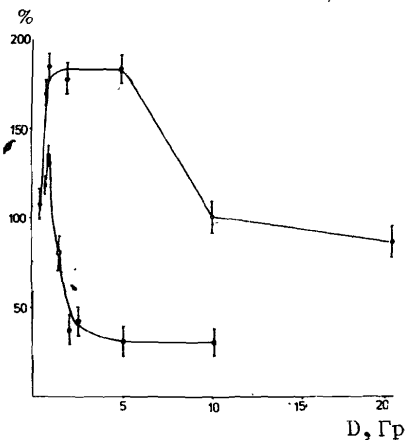


Рис.3. Сравнение роста каллусов двух штаммов руты душистой, облученных нейтронами: кривая 1 - штамм R-20; кривая 2 - штамм R-15. По оси абсцисс: дозы облучения, Гр; по оси ординат: рост каллусов в % от контроля.

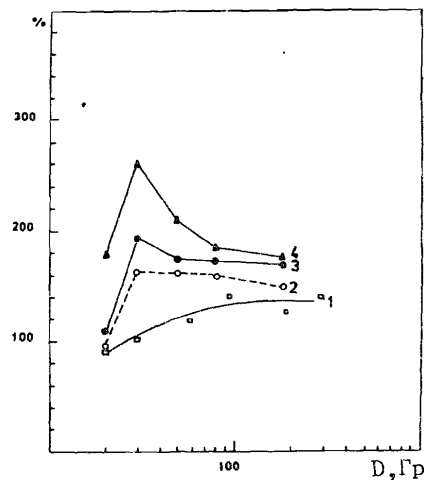


Рис.4. Изменение концентрации рутакридона в зависимости от дозы облучения и мощности дозы для штамма R-20 руты душистой. По оси абсцисс: дозы облучения, Гр; по оси ординат: концентрация рутакридона в % от контроля. Кривая 1 - мощность дозы 0,3; 2-2,5; 3-5; 4-10 Гр/с.

чаях на 250% по отношению к контролю, что, по-видимому, обусловлено репродуктивной гибелью клеток и накоплением в них вторичных метаболитов. Из представленных результатов видно, что изменение концентрации рутакридона увеличивается с возрастанием мощности дозы, а в области 20 Гр наблюдается пороговый эффект влияния высоких мощностей доз на синтез алкалоида рутакридона.

Таким образом, нейтронное облучение вызывает физиологический эффект, выражающийся в стимуляции роста ткани руты, повышением "выхода" алкалоида рутакридона при облучении ее стимулирующими дозами от 0,3 до 5 Гр в первом пассаже после облучения. Можно полагать, что обнаруженный эффект может найти применение в биотехнологии. Однако необходимо иметь в виду, что нейтронное облучение, независимо от величины дозы, вызывает отдаленные, возможно, генетические эффекты, приводящие к резкому торможению и развитию клеток в последующих пассажах.

Авторы выражают благодарность Г.Градечной за техническую помощь в экспериментах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Butcher D.N. In: Plant cell, Tissue, and Organ Culture. Berlin-Heidelberg-New York; Springer-Verlag, 1977, p.668.
2. Staba E.J. In: Plant cell, Tissue, and Organ Culture. Berlin-Heidelberg-New York; Springer-Verlag, 1977, p.694.
3. Zenk M.H., El-Shagi H., Schulte U. In: Planra Medica, supplement 1975, p.79.
4. Радиотоксины, их природа и роль в биологическом действии радиации высоких энергий /сборник/. М.: Атомиздат, 1966.
5. Gerzon K., Svoboda G.H. In: Alkaloids (Ed. A.Brossi). Academic Press, New York, London, 1983, vol.XXI, p.1.
6. Кузина Г.Н. и др. Физиология растений, 1985, № 3, с.551.
7. Гацек Э., Глинкова Е., Исмаилова Э.Н. ОИЯИ, 19-83-509, Дубна, 1983.

8. Назаров В.М., Переседов В.С., Сысоев В.П. Краткие сообщения ОИЯИ, № 6-85, Дубна, 1985, с.42.
9. Кузовкина И.Н. и др. Физиология растений, 1983, № 2, с.409.
10. Neumann D., Muller E. Beiträge zur Physiologie der Alkaloide. V. Alkaloidbildung in Kallus- and Suspensionkulturen von Nicotiana tabacum. В.Р.Р.162, 1971, p.503.
11. Teuscher E. Pharmazie, 1973, 28, 6.

НЕТ ЛИ ПРОБЕЛОВ В ВАШЕЙ БИБЛИОТЕКЕ?

Вы можете получить по почте перечисленные ниже книги, если они не были заказаны ранее.

Д2-82-568	Труды совещания по исследованиям в области релятивистской ядерной физики. Дубна, 1982.	1 р. 75 к.
Д9-82-664	Труды совещания по коллективным методам ускорения. Дубна, 1982.	3 р. 30 к.
Д3,4-82-704	Труды IV Международной школы по нейтронной физике. Дубна, 1982.	5 р. 00 к.
Д11-83-511	Труды совещания по системам и методам аналитических вычислений на ЭВМ и их применению в теоретической физике. Дубна, 1982.	2 р. 50 к.
Д7-83-644	Труды Международной школы-семинара по физике тяжелых ионов. Алушта, 1983.	6 р. 55 к.
Д2,13-83-689	Труды рабочего совещания по проблемам излучения и детектирования гравитационных волн. Дубна, 1983.	2 р. 00 к.
Д13-84-63	Труды XI Международного симпозиума по ядерной электронике. Братислава, Чехословакия, 1983.	4 р. 50 к.
Д2-84-366	Труды 7 Международного совещания по проблемам квантовой теории поля. Алушта, 1984.	4 р. 30 к.
Д1,2-84-599	Труды VII Международного семинара по проблемам физики высоких энергий. Дубна, 1984.	5 р. 50 к.
Д17-84-850	Труды III Международного симпозиума по избранным проблемам статистической механики. Дубна, 1984. /2 тома/	7 р. 75 к.
Д10,11-84-818	Труды V Международного совещания по проблемам математического моделирования, программированию и математическим методам решения физических задач. Дубна, 1983	3 р. 50 к.
	Труды IX Всесоюзного совещания по ускорителям заряженных частиц. Дубна, 1984 /2 тома/	13 р. 50 к.
Д4-85-851	Труды Международной школы по структуре ядра, Алушта, 1985.	3 р. 75 к.
Д11-85-791	Труды Международного совещания по аналитическим вычислениям на ЭВМ и их применению в теоретической физике. Дубна, 1985.	4 р.
Д13-85-793	Труды XII Международного симпозиума по ядерной электронике. Дубна 1985.	4 р. 80 к.

Рукопись поступила в издательский отдел
30 декабря 1986 года.

Заказы на упомянутые книги могут быть направлены по адресу:
101000 Москва, Главпочтамт, п/я 79
Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований

ТЕМАТИЧЕСКИЕ КАТЕГОРИИ ПУБЛИКАЦИЙ
ОБЪЕДИНЕННОГО ИНСТИТУТА ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ

Индекс	Тематика
1.	Экспериментальная физика высоких энергий
2.	Теоретическая физика высоких энергий
3.	Экспериментальная нейтронная физика
4.	Теоретическая физика низких энергий
5.	Математика
6.	Ядерная спектроскопия и радиохимия
7.	Физика тяжелых ионов
8.	Криогеника
9.	Ускорители
10.	Автоматизация обработки экспериментальных данных
11.	Вычислительная математика и техника
12.	Химия
13.	Техника физического эксперимента
14.	Исследования твердых тел и жидкостей ядерными методами
15.	Экспериментальная физика ядерных реакций при низких энергиях
16.	Дозиметрия и физика защиты
17.	Теория конденсированного состояния
18.	Использование результатов и методов фундаментальных физических исследований в смежных областях науки и техники
19.	Биофизика

Гацек Э. и др.

P19-86-853

Влияние нейтронного облучения на рост каллусной ткани руты душистой и содержание в ней рутакридона

Приводятся данные исследований радиочувствительности /по критериям изменения ростового индекса, концентрации рутакридона и "выхода" алкалоида рутакридона/ для двух штаммов R-20 и R-15 руты душистой, различающихся по своей биосинтетической активности. Обсуждаются результаты, полученные при облучении растительной ткани на биофизическом канале ИБР-2, установке "Регата" при разных мощностях доз в импульсе /от 10 до $1 \cdot 10^4$ Гр/с/ в диапазоне доз 0,3-400 Гр. Обнаружено, что нейтронное облучение вызывает физиологический эффект, выражающийся в стимуляции роста ткани руты, повышении "выхода" алкалоида рутакридона при облучении ее стимулирующими дозами от 0,3 до 5,0 Гр в первом пассаже после облучения. Штамм R-15 показал высокую радиочувствительность по сравнению со штаммом-продуцентом. Из полученных на установке "Регата" результатов видно, что концентрация рутакридона увеличивается с возрастанием мощности дозы. Также показано, что во втором пассаже после облучения проявляется подавление ростовой активности как в диапазоне малых, так и больших доз.

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1986

Перевод авторов

Gatsek E. et al.

P19-86-853

The Effect of Neutron Irradiation on the

The paper present data on radiosensitivity of two stems R-20 and R-15 of *Ruta graveolens* (differing in their biosynthetic activity) manifested in the change of growth rate, rutacridon concentration and "yield" of rutacridon alcaloid. The results are discussed of tissue irradiation performed at IBR-2 biophysical complex (Regata installation) under various dose powers in the pulse (from 10 Gr/s to $1 \cdot 10^4$ Gr/s) in the dose range from 0.3 to 400 Gr. It is observed that neutron irradiation stimulates *Ruta graveolens* cell growth, increases the "yield" of rutacridon alcaloid under stimulating doses from 0.3 to 5.0 Gr in the first passage after irradiation. The stem R-15 reveals a higher radiosensitivity then the stem-producent. From the results obtained with Regata installation one may see that the rutacridon concentration increases with increasing doses. Cell growth suppression is observed in the second passage after irradiation both under small and greater doses.

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

Communication of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1986