

О. Ф. Сенюк¹, О. В. Ковальов¹, Л. А. Паламар¹, М. І. Круль¹, Л. Ф. Горовий²

¹ Інститут проблем безпеки АЕС НАН України, Чорнобиль

² Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України, Київ

РАДІОПРОТЕКТОРНИЙ ВПЛИВ НА ДНК МИШЕЙ КОМПЛЕКСІВ БІОПОЛІМЕРІВ З ТРУТОВИКА *FOMES FOMENTARIUS* ЗА ДІЇ ІОНІЗУЮЧИХ ВИПРОМІНЮВАНЬ У МАЛИХ ДОЗАХ

Обговорюються ефекти близьких за значеннями доз зовнішнього загального опромінення (0,19 Гр/4 год і 0,24 Гр/6 міс) на однокиткові розриви ДНК і рівні водневих зв'язків у цій молекулі в різних видах клітин (лімфоцитах, спленоцитах і гепатоцитах) лінійних мишей СС57W/mv, що експонувались у γ -полях, створюваних «гарячими» частинками з аварійного 4-го блока ЧАЕС, які містили однакові радіонукліди в однакових співвідношеннях. Показано можливість нівелювання цих радіаційних ефектів за допомогою комплексів біополімерів з трутовика *Fomes fomentarius*. У модельній системі на основі чистої ДНК фага λ показано здатність меланін-глюканового комплексу безпосередньо протидіяти фрагментації цієї макромолекули продуктами окиснення бензидину, а також нівелювати мутагенний ефект у штамах *Salmonella typhimurium* в класичному тесті Еймса.

Ключові слова: іонізуючі випромінювання, гостра і хронічна дія, ДНК, грибні біополімери.

Іонізуючі випромінювання ушкоджують ДНК (безпосередньо або опосередковано через продукти радіолізу води біологічних середовищ) і призводять до множинних ефектів пошкодження, починаючи від некрозу та апоптозу клітин і закінчуючи метаболічним синдромом, системним запаленням, імунологічними розладами. Перелічені зміни в гомеостазі є визначальними для появи і розвитку новоутворень, змін у перебігу соматичних захворювань, зростанню ментальних розладів і передчасної смерті. Для вивчення закономірностей впливу іонізуючих випромінювань за різних режимів опромінення принципово важливим є дослідження пострадіаційних змін в ядерній ДНК. Однокиткові розриви ДНК (ОНР) є одним з головних пострадіаційних структурних уражень ДНК, переважна більшість яких виникає в результаті пошкодження фосфодиефірного скелета основ і, значною мірою, після окиснення вільними радикалами вуглецевих атомів (С1' і С4') дезоксирибози. Порівняльний аналіз природи кінцевих груп ОНР ДНК, індукованих іонізуючими випромінюваннями з низькою лінійною щільністю енергії і ОН-радикалами, що утворюються з перекису водню, указує на подібність кінцевих груп, утворених ОНР ДНК [1], і дає змогу припустити, що у формуванні цих структурних ушкоджень провідна роль належить гідроксильним радикалам та іншим активним формам кисню.

Головною ознакою радіаційного впливу є накопичення множинних уражень ДНК, які включають скупчення поодиноких ушкоджень (ОНР, ДНР, модифікацію і заміну пар основ, зсув рамки зчитування, міжмолекулярні зшивки ДНК–ДНК і ДНК–білок, генні мутації та ін.) у локальній ділянці ДНК, а також хромосомні ушкодження – різноманітні аберації і фрагментації хромосом.

Пострадіаційні множинні генні мутації і зляквісна трансформація клітин є домінуючими причинами загибелі клітин, виникнення хромосомних і генних мутацій та зляквісної трансформації клітин [2, 3]. Згідно з даними [2, 4 - 7] при опроміненні дозою 1 Гр у клітинній ДНК утворюється ДНР з частотою в межах від $6 \cdot 10^9$ до $10 \cdot 10^9$ ДНР/Гр пар основ, що відповідає 20 - 60 розривам на клітинний геном людини ($3,4 \cdot 10^9$ пар основ). Атака ОН-радикалів і пряма іонізація локальних сайтів ДНК посилює цей процес. Стрімке зростання кількості ОНР асоціюється із прогресуючим збільшенням ДНР ДНК. При цьому співвідношення кількості ОНР і ДНР ДНК може відповідати значенням від 10 до 50 залежно від умов опромінення та виду клітин [1].

Переважаюча кількість повідомлень щодо радіаційних ушкоджень ДНК отримано після опромінення клітин чи багатоклітинних організмів у дозах, що перевищують 0,5 - 1,0 Гр.

Мета дослідження полягала у вивченні структурних змін у клітинній ДНК *in vivo* (рівнів ОНР і стану об'ємної структури ДНК) під впливом малих доз іонізуючих випромінювань та апробації в якості засобів протидії радіаційним ефектам комплексів біополімерів із трутового гриба *Fomes fomentarius*.

Матеріали та методи

Гостре опромінення дослідних мишей (34 самки мишей лінії СС57W/mv, віком від 5 до 9 міс, масою 20 - 24 г) упродовж 4 год було здійснене у відділі матеріалознавства відділення радіотехнологій, матеріалознавства та екологічних досліджень ІПБ АЕС НАН України шляхом розміщення кліток із тваринами на атестованих джере-

лах. Останні є зразками паливовмісних лавоподібних матеріалів, добутих із зруйнованої реакторної зони, що еманують жорсткі β- і γ-випромінювання, 99 % яких пов'язані з ^{137}Cs [8]. Залучені в дослід радіоактивні матеріали створювали ПЕД (потужність експозиційної дози) $\sim 0,047$ Гр/год. При цьому загальна доза зовнішнього γ-опромінювання експонованих мишей становила $\sim 0,19$ Гр.

Для дослідження ефектів тривалого зовнішнього опромінювання на клітинну ДНК в роботі використали 38 самок СС57W/mv мишей віком від 5 до 9 міс, масою 20 - 24 г. Група контролю (неопромінюваних мишей цієї ж лінії) налічувала 24 тварини.

З метою дослідження хронічного впливу малих доз іонізуючих випромінювань були виготовлені спеціальні пласкі бетонні брикети (розмір дна кліток $285 \times 185 \times 35$ мм), на які встановлювали клітки з тваринами. Для цього в суміші цементу з водою максимально рівномірно розмішували попередньо відпалений у муфельній печі ґрунт з паливними «гарячими» частинками [9]. Зразки цього ґрунту були зібрані на території «Рудого лісу», характеризувались питомою активністю на рівні 38 кБк і створювали ПЕД близько 55,0 мкГр/год, що зумовило накопичення дослідними мишами за весь час експозиції (півроку) загальної дози опромінювання 0,24 Гр. Спектральний склад і співвідношення радіоактивних ізотопів в атестованих джерелах, використаних для гострого опромінювання, був аналогічний таким у бетонних брикетах, на яких півроку експонували дослідних мишей.

Для отримання біологічного матеріалу мишей умертвляли шляхом цервікальної дислокації з дотриманням міжнародних рекомендацій щодо виконання медико-біологічних досліджень згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідів чи в інших наукових цілях від 18 березня 1986 р.

Клітинні суспензії із селезінок та печінок дослідних тварин отримували в умовах льодяної бані в кілька кроків – механічне подрібнення тканини органа з промиванням фізіологічним розчином, переміщення біологічного матеріалу у фосфатно-сольовий буфер (рН 7,4) і вилучення клітин із строми органа за допомогою магнітного перемішувача впродовж двох годин; центрифугування клітинних суспензій на градієнтах густини гістопаку (1,076 - 1,078); лімфоцити седиментували з периферичної крові на тих же градієнтах [10, 11].

Для визначення рівнів ОНР ДНК було використано метод розкручування ДНК у лужному середовищі з одночасним міченням флюоресцентним барвником пікогіном (Leiden,

Netherland), який зв'язується лише з двонитковою ДНК [12]. Тест базується на більш швидшому розкручуванні ДНК, в якій утворилась більша кількість ОНР. Величину флюоресценції оцінювали впродовж однієї години при 480 нм екситації і 520 нм емісії за допомогою спеціального рідера (Fluoroskan Tecan, Austria). Результати представляли у вигляді коефіцієнта розчеплення подвійної спіралі (КРС), який розраховували на 20-й хвилині розкручування спіралі ДНК (дсДНК) за формулою

$$\text{КРС} = \log \frac{\% \text{ дс DNA в пробі}}{\% \text{ дс DNA в контролі}}$$

Отримані результати опрацьовували методами варіаційної статистики, за достовірні приймали відмінності при $P < 0,05$ [13].

Ушкодження ДНК визначали за допомогою флюориметричного методу [9], який заснований на зворотному пропорційному зв'язку між кількістю ОНР у ДНК, що призводять до деспіралізації молекул, і інтенсивністю флюоресценції комплексу броміду етидію з ДНК. Максимальна флюоресценція відповідає нативній ДНК. Ушкодження ДНК представляли як відсоток (%) втрати нативності. Джерелом ДНК слугували лімфоцити периферичної крові, клітини селезінок і печінок дослідних мишей (по 5×10^5 в одній лунці планшета).

В якості потенційних модифікаторів радіологічних ефектів на ДНК досліджували комплекси грибних біополімерів із трутовика звичайного *Fomes fomentarius*, які одночасно проявляють радіосорбційні, антиоксидантні, генопротекторні, антиканцерогенні, імуномодулюючі, антиінфекційні та адаптогенні властивості. Це хітин-глюкан-меланіновий комплекс (ХГМК-Ф), який містить хітин у мікрофібрилярній формі – 70 %, β-глюкани в аморфній формі – 20 %, меланінові пігменти в аморфній формі – 10 %, і є порошком коричневого кольору без запаху і смаку. ХГМК-Ф застосовували «per os» з розрахунку 2 г/кг маси щоденно. Інший комплекс меланін-глюкановий (МГК-Ф) містить 90 % меланінів і 10 % β-глюканів, легко розчиняється у воді, має нейтральну реакцію, у сухому вигляді є смолянистою речовиною чорно-коричневого кольору із специфічним грибним запахом, що містить від 15 до 30 % вологи [14]. МГК-Ф апробували при гострому опроміненні мишей у вигляді внутрішньочеревної ін'єкції по 1,5 г/л в ізотонічному розчині, що дає змогу досягти в крові концентрації $1 \cdot 10^2$ мкг/мл. До недавнього часу у вітчизняній фармакології використовувався лише меланіновий пігмент із трутовика скошеного *Inonotus*

obliquus (чага березова) у складі препарату «Бє-фунгін». Трутовики широко розповсюджені в Україні і є перспективною відтворюваною сировиною для отримання меланінів та інших біологічно активних речовин.

Оцінку ДНК-протекторної функції МГК-Ф здійснювали шляхом попередження ним токсичної дії продуктів пероксидного окиснення бензидину на ДНК фага λ , яку виявляли методом електрофоретичного розділення модифікованої і нешкодженної ДНК в 0,9 %-му агарозному гелі на відеоденситометрі Bio Rad, модель 620, і фотографували у прохідному ультрафіолеті [15]. Пероксидазне окиснення бензидину відбувалось у присутності ДНК фага λ (6,0 мкг/мл) в 0,1 М цитратно-ацетатному буфері рН 5,6 упродовж 30 хв при 30 °С. Реакційна суміш (0,020 мл) містила $5 \cdot 10^{-10}$ М пероксидази хрому, $5 \cdot 10^{-6}$ М бензидину, 10^{-3} М H_2O_2 , ДНК і МГК-Ф від 0,034 до 10,0 мкг/мл. Електрофорез здійснювали у 50 мМ трис-боратному буфері рН 8,0 при напруженості електричного поля 70 В при 22 °С [15]. Перед внесенням до гелю в проби додавали барвник бром-феноловий синій (0,025 % у 30 %-му гліцерині). ДНК візуалізували за допомогою флуоресцентного барвника бромистого етидію (0,005 %).

Антимутагенну активність меланін-глюканового комплексу з *F. fomentarius* вивчали у бактеріальному тесті Еймса, що дає змогу оцінити

зворотні мутації від ауксотрофності за гістидином до прототрофності під впливом хімічних сполук і/чи їхніх метаболітів, що індукують мутації типу заміни пар основ чи зсувів рамки зчитування в геномі *Salmonella typhimurium* [16]. Тест здійснювали з системою метаболічної активації непрямого канцерогену бензидину (вихідна концентрація 10^{-5} М) у присутності окиснювальної системи – пероксидази хрому і перекису водню. Класичні мутагени – продукти окиснення бензидину, індукують зворотні мутації від ауксотрофності до прототрофності по гістидину в гістидин-залежних штамів *Salmonella typhimurium* (his-), які не здатні синтезувати амінокислоту гістидин (histidine). За допомогою тесту з'ясується, чи можуть продукти окиснення БД знівелювати ефект існуючої мутації, викликаючи повторну мутацію, що дозволяє бактерії синтезувати гістидин з неорганічного азоту, і такі мутанти дістали назву ревертантів (his+).

Ефект оцінювали, порівнюючи кількість колоній ревертантів у дослідних і контрольних чашках. Спонтанний фон (чистий контроль – дистильована вода) мутацій для цього штаму становить від 40 до 90 колоній.

Отримані результати та їхнє обговорення

Результати дослідження виходу ОНР в ядерній ДНК різних видів клітин мишей СС57W/mv за різних режимів опромінення наведено на рис. 1.

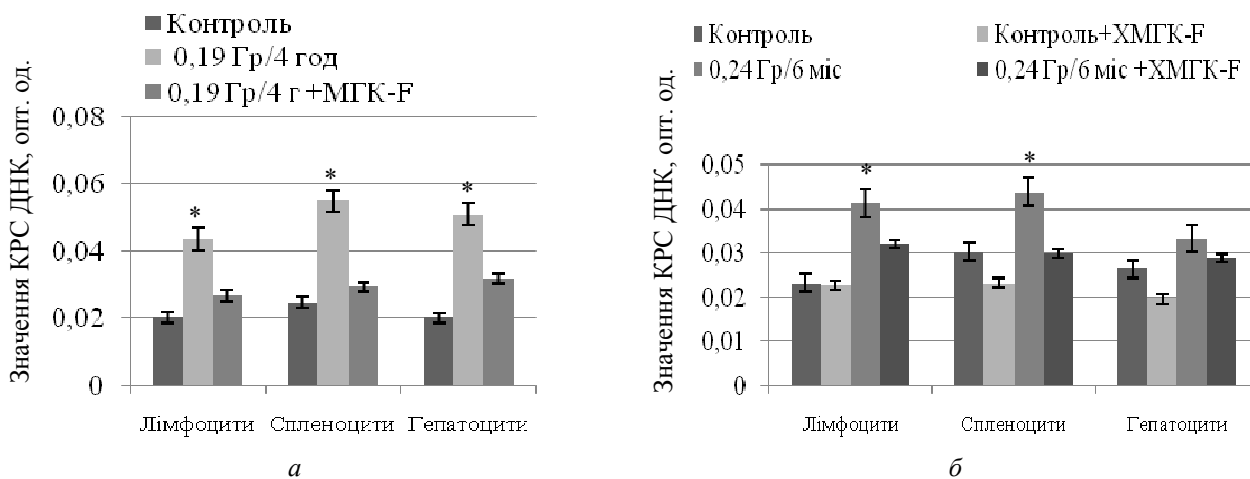


Рис. 1. Вплив близьких доз загального гострого (0,19 Гр/4 год) (а) і хронічного (0,24 Гр/6 міс) (б) опромінення на рівень ОНР ДНК у різних видах клітин мишей СС57W/mv та модифікуючий ефект комплексів грибних біополімерів (ХМГК-Ф і МГК-Ф).

Як свідчать наведені на рис. 1 дані стосовно рівнів ОНР ДНК у різних видах клітин, ефективність гострого за 4 год і хронічного упродовж півроку режимів зовнішнього загального опромінення мишей СС57W/mv, реалізованого близькими за значеннями дозами (0,19 і 0,24 Гр), виявилась співставною. Достовірне зростання рів-

нів ОНР ДНК як в імунокомпетентних (лімфоцитах – на 113 % і спленоцитах – на 122 %), так і в клітинах паренхіматозних органів (гепатоцитах – на 154 %) було зареєстровано за умов кількохгодинної експозиції у змішаних β - та γ -полях, створених «гарячими» паливними частинками. Водночас зростання рівнів ОНР ДНК за умов

піврічної експозиції було менш значимим. У цьому випадку в лімфоцитах і спленоцитах зміни були достовірними, де зростання показника ОНР ДНК становило 78 і 44 % відповідно. Водночас у печінкових клітинах зростання аналогічного показника було недостовірним (приріст його через півроку становив лише 26 %). Слід наголосити, що свій внесок у зростання вихідних рівнів ОНР ДНК здійснили і процеси старіння тварин – за півроку початкові рівні ОНР ДНК у неопромі-

нюваних мишей зростали на 14, 23 і 32 % відповідно в лімфоцитах, спленоцитах і гепатоцитах.

Дослідження ушкодженості стану молекул ДНК у клітинах, опромінених близькими за величиною дозами радіації, що були досягнуті в результаті різних режимів опромінення (гострого і хронічного), засвідчило про зміну кількості вбудовуваного в цю молекулу інтеркалятора пікогріна. Відповідні дані наведено на рис. 2.

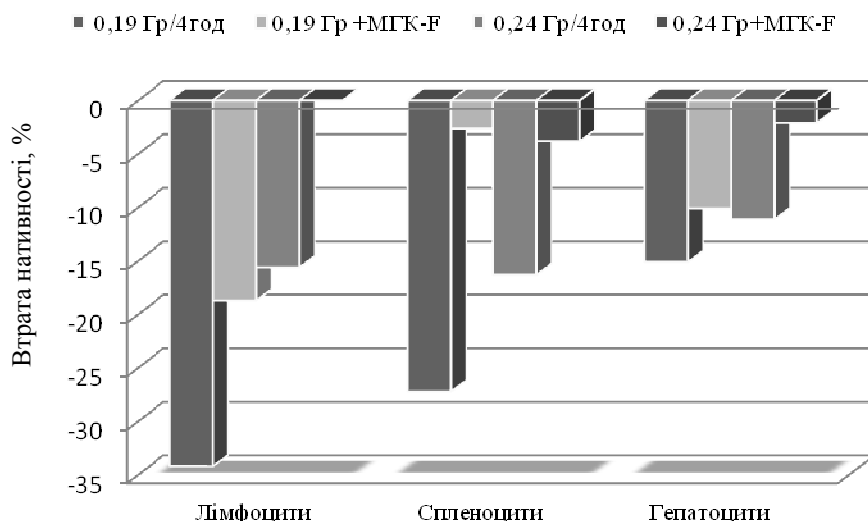


Рис. 2. Ефекти гострого (упродовж 4 год) і хронічного (півроку) опромінення у близьких за значенням дозах (0,19 і 0,24 Гр відповідно) на показник нативності ДНК у різних видах клітин мишей СС57W/mv.

Отримані результати також свідчать, що використання гострого режиму опромінення є більш ефективним у порівнянні з довготривалою експозицією. Після нього радіаційний вплив на об'ємну структуру в кількісному вираженні більший і досягає -34,2, -27,2 і -15,1 % втрати нативності в лімфоцитах, спленоцитах і печінкових клітинах відповідно, коли після піврічної експозиції мишей ефекти опромінення на цей показник є нижчими і становлять -15,6, -16,3 і -11,1 % для лімфоцитів, спленоцитів і гепатоцитів відповідно.

Пікогрін, фіксуючись водневими зв'язками, вбудовується в ДНК лише між парами основ подвійної спіралі. Тому зміни в кількості цього інтеркалятора, вбудованого в ДНК, може опосередковано свідчити про зміну кількості водневих зв'язків у цій молекулі. Від стану останніх залежить лабільність вторинної структури ДНК і можливість її широкої мінливості та суттєвого впливу на перебіг складних і тонких фізіологічних процесів [17], що має виключне значення для феномену життя. Так, у білих лабораторних щурів, які споживали радіонукліди з кормами, було виявлено значну деградацію макромолекул ДНК, збільшення в ній одно- і дwonиткових розривів і, як наслідок, – зменшення середньої мо-

лекулярної маси ДНК та поява в тканинах печінки і селезінки значної кількості низькомолекулярних фракцій. Ці ефекти посилювались з віком, а також у низці поколінь тварин, і вже в шостому і особливо в сьомому поколінні ДНК з клітин щурів старшого віку на 90 % була представлена низькомолекулярною фракцією [18].

Об'ємна структура молекули ДНК у фізіологічних умовах є результатом дуже незначних зрушень рівноваги і дії протилежно направлених сил, що викликають спіралізацію або безладне згортання довгих гнучких ланцюгових молекул, визначаючи високу лабільність об'ємної структури. Іонізуючі випромінювання через ушкодження мембран і відповідно зміну потоків іонів і внутріклітинного рН здатні неспецифічно змінювати об'ємні взаємодії хромосом, індукуючи фазові переходи. Синхронні зміни в первинній і вторинній структурі молекул ДНК можуть сприяти зростанню ефективності радіаційного впливу на рівні генетичного апарату клітини і, як результат, виникають закономірні наслідки ушкодження унікальних генетичних структур клітинного ядра і мітохондрій, що полягають у загибелі клітин, виникненні мутацій і розвитку геномної нестабільності з порушенням нормальної регуляції життєво важливих функцій.

Одним із пояснень високої ефективності тривалої дії малих доз радіації є те, що інформаційні сигнали, носіями яких є кванти променистої енергії, з великою ймовірністю транслюються в попередньо ушкоджений геном [19]. У тканинах, що швидко відновлюються, уражені опроміненням клітини елімінуються, і лише стабільні мутації стовбурових клітин здатні викликати віддаленні наслідки – лейкози та раки. У тканинах, що відновлюються повільно, клітинні ушкодження накопичуються, зменшуючи функціональні потенції органів – скоротливу здатність міокарду, специфічні функції центральної нервової системи, ендокринних залоз, печінки тощо, створюючи основу для трансформації функціональних змін в органічні.

Раніше нами було показано, що 100-добова експозиція мишей Balb/c на бетонних брикетах з «гарячими» паливними частинками з досягненням загальної дози опромінення на рівні 10 сГр є достатньо ефективною стосовно сироваткових рівнів внутріклітинного ферменту аланінаміно-трансферази (АЛТ), який вважається маркером запального процесу в печінці і є непрямим підтвердженням загибелі печінкових клітин *in vivo*. Достовірне збільшення АЛТ має місце вже наприкінці першого місяця спостереження. У тварин, опромінюваних малими дозами, також виявлялась позитивна динаміка сироваткових рівнів аутоантитіл до печінково-специфічного ліпопротеїну – високоспецифічного антигену печінки [20], що є сумішшю антигенних детермінант із мембран гепатоцитів. При цьому аутоімунний процес протікав в'яло, без зовнішніх клінічних проявів і корелював з динамікою змін у патоморфологічній картині печінкової тканини. На зміну ознакам запалення, яке ще неможливо диференціювати як аутоімунний процес, з часом з'являлись ознаки дистрофічних процесів у паренхімі. У місцях інфільтрації поруч з лімфоцитами з'являлись гістиоцити, що свідчило про початок колагенового заміщення ураженої паренхіми. У деяких випадках мали місце глибокі некротичні ураження паренхіми. Аналогічна патоморфологічна картина спостерігалась після введення здоровим мишам сироватки крові опромінених тварин.

Перелік наведених ознак, фактично є ілюстрацією послідовних змін, пов'язаних із впливом іонізуючих випромінювань на печінкові клітини експонованих мишей, починаючи з молекулярно-генетичного рівня і закінчуючи органотканиним. Пострадіаційні структурні ушкодження ДНК гепатоцитів асоціювались з набуттям опроміненими клітинами здатності продукувати сигнали, що індукують пошкодження структури

ДНК, із зменшенням ефективності репараційних процесів, зростанням втрат у клітинних популяціях печінки, опосередкованих некрозом та апоптозом клітин, з подальшим демаскуванням антигенів і відміною імунної толерантності, що на тканинному рівні з часом призводить до появи всіх типових ознак загальнозапальної та імунної реакції проти власних антигенів печінки з формуванням аутоімунного гепатиту [21]. Таким чином, нелінійні ефекти після опромінення малими дозами не є артефактом. Вони віддзеркалюють роботу механізмів, що забезпечують стійкість і адаптацію біосистем до мінливих умов довкілля.

На молекулярно-генетичному рівні структурної організації живої системи в ролі біологічних посилювачів радіаційних ефектів, власне сигналів про дію іонізуючих випромінювань, виступають оксирадикали та вільнорадикальні молекули з різною тривалістю життя (продукти перекисного окиснення ліпідів та вільні радикали білкової природи). Ось чому в роботі було зроблено спробу в якості ДНК-протекторного засобу апробувати природні меланіни в складі хітин-меланін-глюканового та меланін-глюканового комплексів з *Fomes fomentarius*, апелюючи до їхніх потужних антиоксидантних властивостей.

Як свідчать дані, що містяться на рис. 1, як внутрішньочеревне введення мишам СС57W/mv розчину МГК-Ф напередодні гострого опромінення дозою 0,19 Гр/4 год, так і тривале згодовування їм ХМГК-Ф з кормами впродовж усього терміну експозиції (півроку) чинить однонаправлену нормалізуючу дію на рівні ОНР ДНК і показника її нативності. У групах опромінених мишей, які отримали напередодні процедури гострого опромінення ін'єкцію розчину МГК-Ф внутрішньочеревно, так само як і у тварин, які впродовж півроку експонувались на пробах ґрунтів з «гарячими» паливними частинками і вживали ХМГК-Ф з кормами, ефективність опромінення стосовно показника ОНР ДНК і нативності ДНК у різних видах клітин була мінімальною. При цьому рівні вказаного показника в захищених тварин зростали недостовірно, і приріст рівнів ОНР ДНК становив 31, 19 і 59 % відповідно для лімфоцитів, спленоцитів і печінкових клітин, при цьому показник втрати нативності був вдвічі нижчим за цей показник в опромінених мишей, які не були захищені ін'єкцією МГК-Ф перед опроміненням. Аналогічні тенденції у змінах показника ОНР ДНК було виявлено і за умов хронічної експозиції мишей СС57W/mv. В опромінюваних тварин, яким згодовували ХМГК-Ф, зростання рівнів ОНР ДНК було також незначним – на 38 % в лімфоцитах крові і на 10 % у гепатоцитах, а втрати показника нативності спо-

стерігались лише у спленocyтaх і гепатocyтaх, не спускаючись нижче 3,8 %.

Для з'ясування механізму ДНК-протекторної дії грибних меланінів у складі МГК-*F* було досліджено його ефективність відносно ДНК фага λ, інкубованого з бензидином і вільнорадикальними продуктами його окислення, що утворюються в присутності H₂O₂. Отримані дані наведено на рис. 3. Як свідчать дані, наведені на цьому

рисунку, інкубація ДНК фага λ з продуктами окиснення бензидину призводить до сильної її фрагментації, про що свідчить рухливість ДНК на електрофореграмах. Концентрація МГК-*F*, внесеного в культуральне середовище, коливалась від 0,034 до 10,0 мкг/мл. При введенні в інкубаційне середовище розчинних МГК-*F* має місце нейтралізація дії цих продуктів бензидину.

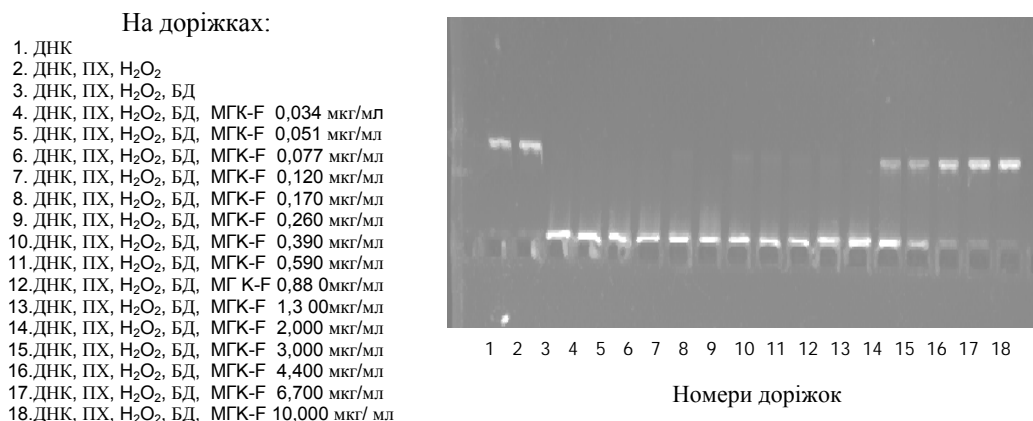


Рис. 3. Пригнічення виникнення ушкоджень ДНК фага λ продуктами пероксидазного окиснення бензидину меланінами з *F. fomentarius*.

Ефект стає добре помітним при концентрації ДНК-протектора 2 мкг/мл, а при 10 мкг/мл дія вільнорадикальних продуктів окислення бензидину повністю нейтралізується. У цьому випадку меланін з МГК-*F* виконує роль полімерної матриці для ковалентної модифікації пероксидазни-

ми оксидантами бензидину і є ефективним інгібітором реакцій окиснення амінобіфенілів. Очевидно, механізм його ДНК-захисної дії зумовлений більш ефективною взаємодією канцерогенних продуктів окиснення бензидину з електрофільними центрами меланіну, ніж з ДНК.

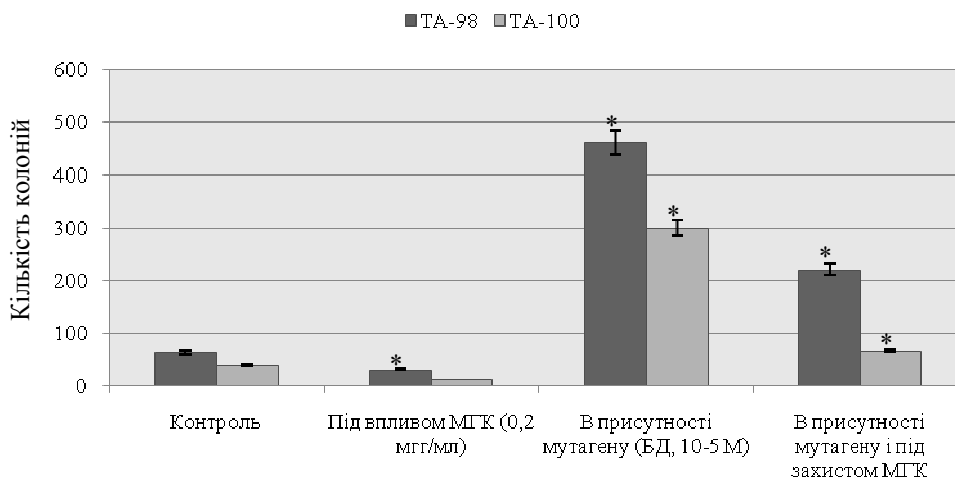


Рис. 4. Вплив МГК з *F. fomentarius* на індукцію продуктами окиснення бензидину ревертантних штамів *S. typhimurium*.

Виявлена здатність МГК-*F* суттєво зменшувати рівні ОНР ДНК в опромінюваних клітинах та упереджувати фрагментацію ДНК фага λ продуктами окиснення бензидину спонукала здійснити

наступний крок у дослідженні меланін-залежних механізмів захисту молекули ДНК, а саме переконатись у здатності МГК-*F* реалізувати генопротекторний ефект. Для цього було використано

но класичну модельну систему на основі музейних штамів *Salmonella typhimurium* TA-98 і TA-100, які в присутності мутагенів є джерелами для ревертантних штамів. Отримані результати представлено на рис. 4.

Як свідчать дані, наведені на рис. 4, продукти окиснення бензидину, що були додані в культуральне середовище в концентрації 10^{-5} М, достовірно стимулювали ріст ревертантів у штамів досліджуваної бактерії. Відповідно для штаму TA-100 це зростання становило 7,3 рази, а для штаму TA-98 – 7,9 разів. Установлено, що МГК-F в концентрації 0,2 мг/мл достовірно зменшує кількість ревертантів, індукованих мутагенними продуктами окиснення бензидину, в 4,5 рази в штамі TA-100 та понад два рази у штамі TA-98. Механізм виникнення таких мутацій у досліджуваних штамів бактерій може бути пов'язаний з пошкодженням ДНК електрофільними продуктами пероксидазного окиснення бензидину, основна кількість яких припадає на діміни. Останні є біфункціональними реагентами, що потенційно здатні викликати міжниткові зшивки ДНК та перехресні зшивки ДНК - ДНК. У штаму *S. typhimurium* TA-100 після впливу мутагену ревертанти з'являються в результаті заміни пар основ, коли у випадку *S. typhimurium* TA-98 мутагени викликають пошкодження ДНК типу зсуву рамки зчитування генетичного коду.

Аналізуючи антимутагенний вплив МГК-F на бактерії вказаних штамів *S. typhimurium*, можна зробити висновок про те, що цей субстрат більшою мірою запобігає появі мутацій шляхом заміни пар основ (*S. typhimurium* TA-100) та дещо меншою – появі мутацій за типом зсуву рамки зчитування (*S. typhimurium* TA-98). Він є потужним окиснювачем, який суттєво знижує мутагену

активність та виникнення обумовлених нею мутацій. Таким чином, ушкодження ДНК продуктами пероксидазного окиснення амінобіфенілів є мірою їхньої генотоксичності [22, 23]. Продукти окиснення бензидину викликають збільшення точкових мутацій на кшталт заміни пар основ і зсуву рамки зчитування.

Висновки

1. При використанні гострого (0,19 Гр упродовж 4 год) і хронічного (0,24 Гр за піврічну експозицію) режимів зовнішнього опромінення мишей лінії CC57W/mv від радіонуклідів, що містяться в «гарячих» паливних частинках, виявлено співставну ефективність близьких до загального гострого і хронічного опромінення стосовно рівнів ОНР ДНК в різних видах клітин.

2. Відносно високу ефективність хронічного опромінення малими дозами можна логічно пояснити, лише припустивши більш інтенсивне формування дефектів у репараційних процесах у випадку тривалого опромінення.

3. Здатність меланінових пігментів у складі МГК з *F. fomentarius* упереджувати пошкодження ДНК у процесі метаболічної активації амінобіфенілів пероксидазним шляхом окиснення можна розглядати як прояв ДНК-протекторної і антимутагенної дії цих пігментів.

4. Отримані дані дають змогу припустити, що досліджувані комплекси біополімерів з *F. fomentarius* можуть бути основою для створення ефективних засобів протидії несприятливим радіаційним ефектам у ссавців при хронічному та гострому опроміненні в діапазоні малих і середніх доз.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants* / Ed. by H. Sies. - N.Y: Academic. - 1991. - 546 p.
2. *Ward J.F.* DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation and reparability // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* - 1988. - Vol. 35. - P.95 - 125.
3. *Pfeiffer P., Gottlich B., Reichenberger S. et al.* DNA Lesions and Repair // *Mut. Res. Rev. Gen. Tox.* - 1996. - Vol. 366, No. 2. - P. 69 - 80.
4. *Prise K.M., Ahnstrom G., Belli M. et al.* A review of DSB induction data for varying quality radiations // *Int. J. Radiat. Biol.* - 1998. - Vol. 74. - P. 173 - 184.
5. *Sachs R.K., Brenner D.J., Hahnfeldt P.J., Hlatkys L.R.* A formalism for analyzing large-scale clustering of radiation-induced breaks along chromosomes // *Int. J. Radiat. Biol.* - 1998. - Vol. 74. - P. 185 - 206.
6. *Newman H.C., Praise K.M., Folkard M., Michael B.D.* DNA double-strand break distributions in X-ray and λ -particle irradiated V79 cells: evidence for non-random breakage // *Int. J. Radiat. Biol.* - 1997. - Vol. 71. - P. 347 - 363.
7. *Dikomey E., Dahm-Daphi J., Brammer I. et al.* Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines // *Int. J. Radiat. Biol.* - 1998. - Vol. 73. - P. 269 - 278.
8. *Жидков О.В.* Електронні процеси в опроміненіх діелектриках та властивості композицій, що містять ядерне паливо: Дис. ... д-ра фіз.-мат. наук / Інститут фізики конденсованих систем НАН України. - Львів, 2007.
9. *Ковалев В.А., Сенюк О.Ф.* Состояние толерантности в условиях воздействия ионизирующих излучений «чернобыльского спектра» // *Экологический вестник.* - 2008. - Вып. 5, № 2. - С. 36 - 43.
10. *Boyum A.* Isolation of mononuclear cells and granulo-

- cytes from human blood // *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* - 1968. - No. 21 (Suppl. 97). - P. 77 - 89.
11. *Kravchenko L.P., Petrenko A.Yu., Fuller B.A.* A simple non- enzymatic method for the isolation of high yield of functional rat hepatocytes // *Cell Biology International.* - 2002. - Vol. 26, No. 11. - P. 1003 - 1006.
 12. *Mendorff-Dreikorn K. El., Chauvin Ch., Slor H. et al.* Assessment of DNA damage and repair in human peripheral blood mononuclear cells using a novel DNA unwinding technique // *Cellular and Molecular Biology.* - 1999. - Vol. 45, No. 2. - P. 211 - 218.
 13. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for quantitation and microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding // *Anal. Biochem.* - 1977. - Vol. 86. - P. 193 - 200.
 14. *Горовой Л.Ф., Косяков В.Н.* // Пат. РФ № 2073015, МПК C08B37/08. - 1991.
 15. *Остерман Л.А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. - М.: Наука, 1981. - 260 с.
 16. *Mortelmans K., Zeiger E.* The Ames Salmonella/microsome mutagenicity test // *Mutat. Res.* - 2000. - Vol. 455. - P. 29 - 60.
 17. *Андреев С.Г.* Стохастические и структурно-временные эффекты в физике биологического действия радиации: Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук. - М.: МИФИ. - 1981. - 16 с.
 18. *Благой Ю.П., Корнилова С.В., Леонтьев В.С. и др.* Структурные и физико-химические характеристики ДНК из тканей животных, подвергнутых длительному хроническому облучению в зоне Чернобыля // *Биофизика.* - 1994. - Т. 39, № 4. - С. 637 - 645.
 19. *Бурлакова Е.Б., Михайлов В.Ф., Мазурик В.К.* Система окислительно-восстановительного гомеостаза при радиационно-индуцируемой нестабильности генома // *Радиационная биология и радиозащита.* - 2001. - Т. 41, № 6. - С. 489 - 499.
 20. *Krawitt E.L.* Autoimmune Hepatitis // *The New England Journal of Medicine.* - 1996. - Vol. 334, No. 14. - P. 897 - 903.
 21. *Ковалев В., Круль Н., Жежеря В., Сенюк О.* Аутоиммунный гепатит как результат хронического облучения малыми дозами радиации // *Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. Біологія.* - 2010. - Вип. 27. - С. 245 - 249.
 22. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. - М.: Мир, 1984. - С. 157 - 175.
 23. *Сейц И.Ф., Князев П.Г.* Молекулярная онкология. - Л.: Медицина, 1986. - 399 с.

О. Ф. Сенюк¹, О. В. Ковалев¹, Л. А. Паламар¹, Н. И. Круль¹, Л. Ф. Горовой²

¹ *Институт проблем безопасности АЭС НАН Украины, Чернобыль*

² *Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев*

РАДИОПРОТЕКТОРНОЕ ВЛИЯНИЕ НА ДНК МЫШЕЙ БИОПОЛИМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ ИЗ ТРУТОВИКА *FOMES FOMENTARIUS* ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ В МАЛЫХ ДОЗАХ

Обсуждаются эффекты близких по значениям доз внешнего общего облучения (0,19 Гр/4 ч и 0,24 Гр/6 мес) на одностранные разрывы ДНК и уровни водородных связей в этой молекуле в разных видах клеток (лимфоцитах, спленоцитах и гепатоцитах) линейных мышей СС57W/mv, которые экспонировались в γ -полях, создаваемых «горячими» частицами из аварийного 4-го блока ЧАЭС, содержащих одинаковые радионуклиды в одинаковых соотношениях. Показана возможность нивелирования этих радиационных эффектов при помощи комплексов биополимеров из трутовика *Fomes fomentarius*. В модельной системе на основе чистой ДНК фага λ показана способность меланин-глюканового комплекса непосредственно противодействовать фрагментации этой макромолекулы продуктами окисления бензидина, а также нивелировать мутагенный эффект в штаммах *Salmonella typhimurium* в классическом тесте Эймса.

Ключевые слова: ионизирующие излучения, острое и хроническое воздействие, ДНК, грибные биополимеры.

O. F. Seniuk¹, V. O. Kovalev¹, L. A. Palamar¹, M. I. Krul¹, L. F. Gorovoj²

¹ *Institute for Safety Problems of Nuclear Power Plants, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

² *Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

RADIOPROTECTIVE INFLUENCE ON MICE DNA OF BIOPOLYMER COMPLEXES FROM TINDER *FOMES FOMENTARIUS* UNDER IONIZING RADIATION IN SMALL DOSES

The effects of similar doses of the values of common external irradiation (0,19 Gy/4hours and 0,24 Gy/6 months) at single-strand DNA breaks and the level of the hydrogen bonds in this molecule in different cell types (lymphocytes, hepatocytes and splenocytes) linear mice CC57W/mv are discussed. Mice were exposed to γ -fields produced by "hot" particles of emergency 4-th Chernobyl Unit containing the same radionuclides in the proportions. The possibility of leveling the radiation effects using complex biopolymers from *Fomes fomentarius* was shown. The ability of melanin-glucan complex to directly counteract the fragmentation of DNA in a model system with lambda phage this macromolecule oxidation products of benzidine and neutralize mutagenic effect in *Salmonella typhimurium* strains in the classical Ames test was studied.

Keywords: ionizing radiation, acute and chronic effects, DNA, fungal biopolymers.

REFERENCES

1. *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants* / Ed. by H. Sies. - N.Y: Academic. - 1991. - 546 p.
2. *Ward J.F.* DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation and reparability // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* - 1988. - Vol. 35. - P.95 - 125.
3. *Pfeiffer P., Gottlich B., Reichenberger S. et al.* DNA Lesions and Repair // *Mut. Res. Rev. Gen. Tox.* - 1996. - Vol. 366, No. 2. - P. 69 - 80.
4. *Prise K.M., Ahnstrom G., Belli M. et al.* A review of DSB induction data for varying quality radiations // *Int. J. Radiat. Biol.* - 1998. - Vol. 74. - P. 173 - 184.
5. *Sachs R.K., Brenner D.J., Hahnfeldt P.J., Hlatkys L.R.* A formalism for analyzing large-scale clustering of radiation-induced breaks along chromosomes // *Int. J. Radiat. Biol.* - 1998. - Vol. 74. - P. 185 - 206.
6. *Newman H.C., Praise K.M., Folkard M., Michael B.D.* DNA double-strand break distributions in X-ray and λ -particle irradiated V79 cells: evidence for non-random breakage // *Int. J. Radiat. Biol.* - 1997. - Vol. 71. - P. 347 - 363.
7. *Dikomey E., Dahm-Daphi J., Brammer I. et al.* Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines // *Int. J. Radiat. Biol.* - 1998. - Vol. 73. - P. 269 - 278.
8. *Zhydkov O.V.* Electronic processes in irradiated dielectrics and compositions properties comprising nuclear fuel: Thesis / Institute for Condensed Matter Physics of the NAS of Ukraine. - Lviv, 2007. (Rus)
9. *Kovalev V.A., Senyuk O.F.* // *Ekologicheskij vestnik.* - 2008. - Iss. 5, No. 2. - P. 36 - 43. (Rus)
10. *Boyum A.* Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood // *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* - 1968. - No. 21 (Suppl. 97). - P. 77 - 89.
11. *Kravchenko L.P., Petrenko A.Yu., Fuller B.A.* A simple non- enzymatic method for the isolation of high yield of functional rat hepatocytes // *Cell Biology International.* - 2002. - Vol. 26, No. 11. - P. 1003 - 1006.
12. *Mendorff-Dreikorn K. El., Chauvin Ch., Slor H. et al.* Assessment of DNA damage and repair in human peripheral blood mononuclear cells using a novel DNA unwinding technique // *Cellular and Molecular Biology.* - 1999. - Vol. 45, No. 2. - P. 211 - 218.
13. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for quantitation and microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding // *Anal. Biochem.* - 1977. - Vol. 86. - P. 193 - 200.
14. *Gorovoj L.F., Kosyakov V.N.* / Patent RF № 2073015, MPK C08B37/08. - 1991. (Rus)
15. *Osterman L.A.* Methods of proteins and nucleic acids study: electrophoresis and ultracentrifugation. - Moskva: Nauka, 1981. - 260 p. (Rus)
16. *Mortelmans K., Zeiger E.* The Ames Salmonella/microsome mutagenicity test // *Mutat. Res.* - 2000. - Vol. 455. - P. 29 - 60.
17. *Andreev S.G.* Stochastic and structural-temporal effects in physics of biological action of radiation: Thesis abstract. - Moskva, MEPI, 1981. - 16 p. (Rus)
18. *Blagoj Yu.P., Kornilova S.V., Leont'ev V.S. et al.* // *Biofizika.* - 1994. - Vol. 39, No. 4. - P. 637 - 645. (Rus)
19. *Burlakova E.B., Mikhajlov V.F., Mazurik V.K.* // *Radiats. biol. i radioekol.* - 2001. - Vol. 41, No. 6. - P. 489 - 499. (Tusd)
20. *Krawitt E.L.* The New England Journal of Medicine. - 1996. - Vol. 334, No. 14. - P. 897 - 903.
21. *Kovalev V., Krul' N., Zhezhera V., Senyuk O.* // *Nauk. visn. Uzhgorod. un-tu. Ser. Biologiya.* - 2010. - Iss. 27. - P. 245 - 249. (Rus)
22. *Maniatis T., Fritch E., Sembruk Dzh.* Molecular cloning. - Moskva: Mir, 1984. - P. 157 - 175. (Rus)
23. *Sejts I.F., Knyazev P.G.* Molecular oncology. - Lenin-grad: Meditsina, 1986. - 399 p. (Rus)

Надійшла 10.02.2014

Received 10.02.2014