

УДК 577.342

ВЛИЯНИЕ СРЕДЫ С МОДИФИЦИРОВАННЫМ ИЗОТОПНЫМ D/H СОСТАВОМ НА РЕПАРАЦИЮ ДНК ЛИМФОЦИТОВ ПОСЛЕ УФ ОБЛУЧЕНИЯ

¹Елкина А.А., ¹Шашков Д.И., ²Барышева Е.В.

¹ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Краснодар, e-mail: 013194@mail.ru;

²ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет», Краснодар

В результате исследования доказано, что среда с пониженным содержанием дейтерия (50 и 40 ppm) оказывает положительное влияние на метаболические процессы в живых системах, а именно на репаративные системы ДНК, что способствует уменьшению количества однонитевых разрывов. Молекулы ДНК выделяли из взвеси лимфоцитов лабораторных животных. При помощи воздействия ультрафиолетового излучения в течении 1 часа и 30 минут на лимфоциты животных вызывали увеличение количества однонитевых разрывов, которое оценивали по интенсивности флуоресценции образцов с помощью флуоресцентного спектрофлуориметра Hitachi F-2700.

Ключевые слова: однонитевые разрывы ДНК, ультрафиолетовое излучение, дейтерий, спектрофлуориметр, флуоресценция

THE INFLUENCE MEDIUM WITH DIFFERENT ISOTOPIC D/H COMPOSITION ON LYMPHOCYTES DNA REPAIR AFTER UV RADIATION

¹Elkina A.A., ¹Shashkov D.I., ²Barysheva E.V.

¹Kuban State University, Krasnodar, e-mail: 013194@mail.ru;

²Kuban State Medical University, Krasnodar

As a result of research it is proved that environment with low deuterium substance (50 and 40 ppm) has a positive effect on metabolic processes in live systems, namely on the DNA reparative system. It helps to reduce the number of the single-strand tears. DNA molecules allocated from lymphocyte suspension of laboratory animals. Exposure of ultraviolet radiation for 1 hour and 30 minutes on animal's lymphocytes caused increase quantity the single-strand tears, which was estimated on intensity of fluorescence of samples using a fluorescent spectrofluorimeter Hitachi F-2700.

Keywords: single-stranded DNA breaks, ultraviolet radiation, deuterium, spectrofluorimeter, fluorescence

За все время своего существования человечество, по причине естественного мутационного процесса, накопило генетический груз, который проявляется во всевозможных наследственных генетических заболеваниях. Какое число мутаций накопило человечество, какой генетический груз мы получили в наследство от наших предков, такое здоровье и будет у нас и всех последующих поколений.

Старение организма связано с постепенным накоплением ошибок ДНК, возникающих в связи с разрывом цепей, с ошибками репарации ДНК. Поэтому, логично рассмотреть факторы, которые неблагоприятно воздействуют на ДНК. Считается, что самым распространенным мутагеном, повреждающим ДНК является солнечная радиация, в частности, ультрафиолетовое излучение. Из года в год ультрафиолетовое излучение становится более агрессивным и оказывает все большее влияние на геном человека, и организм в целом, вызывая рак кожи, меланому кожи, её преждевременное старение, ожог роговицы глаза и так далее [3]. Именно поэтому исследования в об-

ласти снижения влияния ультрафиолетового излучения на ДНК особенно актуальны в наше время.

На ДНК так же отрицательно воздействует и «тяжелая» вода (D₂O, оксид дейтерия). Внедряясь в структуру ДНК и различных РНК, дейтерий может явиться причиной рекомбинаций. Известны, по крайней мере, две различные реакции такого рода: разрывы нитей ДНК и потери участков ДНК. Установлено, что облегченная вода при индукции апоптоза активирует репаративные системы ДНК [9].

В условиях модели окислительного стресса на животных было установлено влияние низких концентраций дейтерия воды на показатели антиоксидантной защиты организма [1, 2]. Также показано, что потребление воды с пониженным содержанием дейтерия способствует уменьшению его концентрации в биологических жидкостях [4, 6]. Экспериментально показано, что при введении воды с пониженным содержанием дейтерия в питьевой рацион лабораторных животных наблюдается увеличение массы тела крыс

и происходит коррекция метаболических процессов [7]. Доказано влияние изотопного состава среды на концентрацию клеточной биомассы *Rhodococcus erythropolis* (нефтеокисляющей актинобактерии), а именно, при инокуляции клетками актинобактерии *Rhodococcus erythropolis*, которых вырастили на среде с содержанием дейтерия 71 и 98 ppm, просматривалось внушительное увеличение клеточной биомассы по сравнению с контрольными образцами [8].

Таким образом, целью работы являлось исследование возможности восстановления одностранных разрывов ДНК после облучения ультрафиолетовым излучением с помощью модификации изотопного (D/H) состава среды.

Материалы и методы исследования

В ходе эксперимента кровь животных (крысы) разделили на 3 группы:

группа 1 – инкубирование лимфоцитов животных проводили в физиологическом растворе (150 ± 2 ppm) при комнатной температуре;

группа 2 – инкубирование лимфоцитов животных проводили в физиологическом растворе на воде с пониженным содержанием дейтерия (50 ± 2 ppm) при комнатной температуре;

группа 3 – инкубирование лимфоцитов животных проводили в физиологическом растворе на воде с пониженным содержанием дейтерия (40 ± 2 ppm) при комнатной температуре.

Выделение лимфоцитов для всех групп проводили по следующей методике. В пробирки с кровью добавили физиологический раствор, в количестве равном объему крови, содержащейся в них. Далее вносили в новые пробирки А (эппендорфы) фиколл-урографин в объеме 0,5 мл и методом наложения в каждую пробирку добавляли 0,5 мл крови. Пробирки А центрифугировали 20 минут при 4000 об/мин, затем, образовавшееся в центральной части пробирок кольцо мононуклеарных клеток переносили в пробирки Б.

Следующим шагом было внесение в пробирки Б физиологического раствора для всех групп в объеме, равному 1 мл. Пробирки Б центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин. Удалив надосадочную жидкость, внесли в пробирки Б физиологический раствор в объеме 0,5 мл. Далее, на Вортексе интенсивно встряхивали пробирки 3-5 секунд. После еще одного центрифугирования (10 минут на 4000 об/мин), удалили надосадочную жидкость. После этого полученные лимфоциты трехкратно отмывались в физиологическом растворе.

Следующим этапом в работе было воздействие на выделенные лимфоциты УФ излучением. Для обработки образцов использовали ртутную дуговую лампу типа ДРЛ 125 – газоразрядная ртутная лампа высокого давления, мощностью 125 В, длиной волны 280 – 400 нм и световым потоком 5900 лм, без внешней колбы с люминофором. Таким образом, в световом потоке присутствовало только ультрафиолетовое излучение.

Обработку УФ излучением производили следующим образом: часть образцов из каждой группы нахо-

дились под воздействием ультрафиолетового излучения 30 минут, еще одна часть образцов подвергалась воздействию 1 час.

Далее, лимфоциты инкубировались в физиологическом растворе (150 ± 5 ppm) для группы № 1, в физиологическом растворе на воде с пониженным содержанием дейтерия (50 ± 2 ppm) для группы № 2 и в физиологическом растворе на воде с пониженным содержанием дейтерия (40 ± 2 ppm) для группы № 3 при комнатной температуре в течении 24 часов. После этого клетки лизировали 4,5 М раствором мочевины в течение 10 мин при температуре 24 °С. Лизаты клеток в экспериментальных образцах подвергали щелочной обработке в течение 30 мин при 0 °С, а затем подвергали интенсивному встряхиванию на Вортексе в течение 15 с. Контрольные образцы щелочной обработке не подвергали и использовали для определения фоновой флуоресценции. После этого во все образцы добавляли раствор бромистого этидия.

После щелочной обработки лизатов и добавления бромистого этидия измеряли интенсивность флуоресценции полученных образцов в кварцевой кювете на флуоресцентном спектрофлуориметре Hitachi F-2700 при $\lambda_{\text{пол}} = 610 \pm 5$ нм под прямым углом к направлению возбуждающего света [9].

Определение концентрации дейтерия в жидких средах проводили на импульсном ЯМР спектрометре JEOL JNM-ECA 400 MHz по методике, описанной в [5].

Результаты исследования и их обсуждение

При воздействии УФ-излучения до 80% повреждений ДНК в живых клетках индуцируется именно синглетным кислородом. С учётом того факта, что примерно 30% повреждений ДНК, индуцированных синглетным кислородом, представляют собой щелочнолабильные сайты, а ещё 2 – 5% одностранные разрывы можно заключить, что при воздействии УФ излучения синглетный кислород является не менее важным источником одностранных разрывов и щелочнолабильных сайтов ДНК, чем гидроксил радикал.

Число одностранных разрывов ДНК оценивали по соотношению величин флуоресценции экспериментальных и контрольных образцов. Результаты представляли в виде процентного соотношения количества щелочнолабильных сайтов ДНК, содержащих одностранные разрывы к общему количеству ДНК. Воду с пониженным содержанием дейтерия производили на разработанной в Кубанском государственном университете установке ЛВ-1 [10].

Полученные данные анализировали в пакете статистического анализа Statistica 6.0. Сравнение групп по количественным признакам проводили с использованием двухвыборочного t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

На рис. 1 представлена интенсивность флуоресценции растворов без УФ облучения.

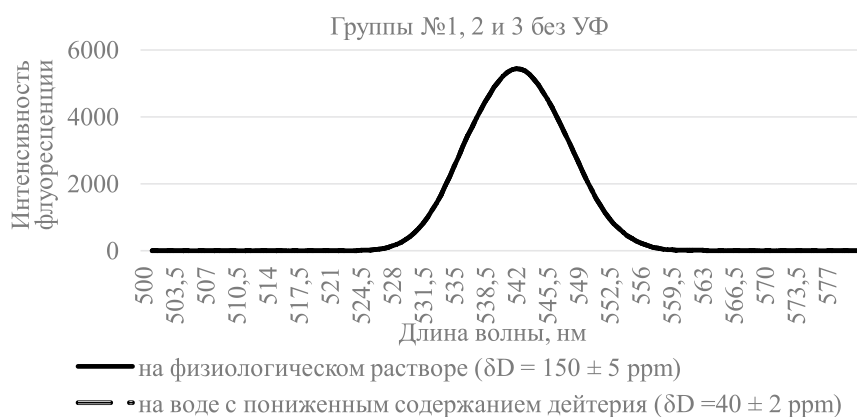


Рис. 1. Интенсивность флуоресценции раствора бромистого этидия с лизатами лимфоцитов, инкубируемых в среде с различным содержанием дейтерия, без УФ облучения образцов

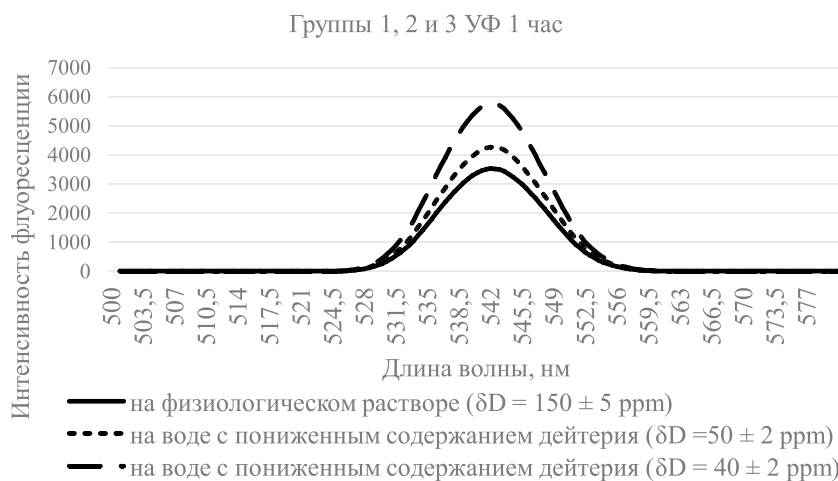


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции раствора бромистого этидия с лизатами лимфоцитов, инкубируемых в среде с различным содержанием дейтерия, с УФ облучением образцов по времени, равному 1 час

Как видно из рис. 2, интенсивность свечения раствора лимфоцитов, проинкубированных в обедненной дейтерием воде с 50 и 40 ppm, при облучении УФ, равному 1 час, больше, чем у раствора лимфоцитов проинкубированных в обычной воде (150 ppm), что свидетельствует об уменьшении количества одонитевых разрывов при инкубации лимфоцитов в обедненной дейтерием воде, причем вне зависимости от времени, проведенного под воздействием УФ облучения. Аналогичную картину мы наблюдаем на рис. 3, где образцы были проинкубированы в обедненной дейтерием воде с концентрацией 50 и 40 ppm при облучении образцов, равному по времени 30 минут.

На рис. 4 представлено процентное соотношение одонитевых разрывов при различных содержаниях дейтерия в растворе и разном времени обработки образцов УФ излучением.

Как видно из полученных результатов, количество одонитевых разрывов меньше в образцах, проинкубированных в среде с пониженным содержанием дейтерия 50 ppm и 40 ppm. Как следствие, можно утверждать, что вода с пониженным содержанием дейтерия оказывает положительное влияние на сохранность ДНК, кроме того, это явление не зависит от продолжительности облучения УФ образцов.

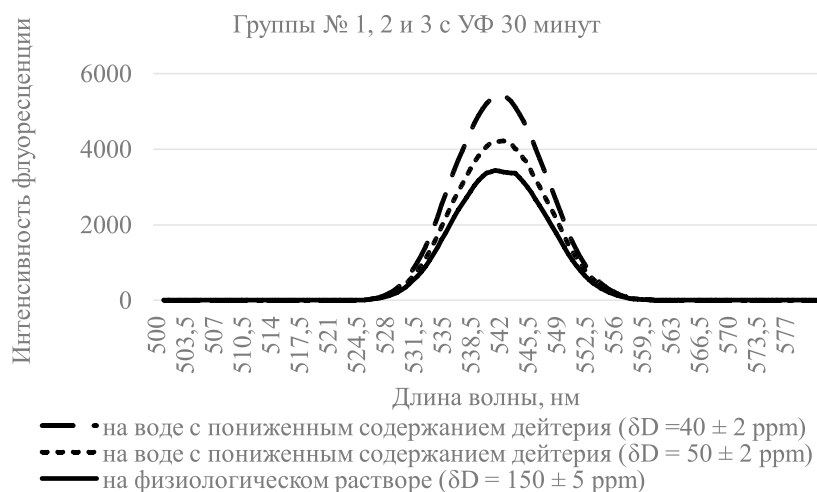


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции раствора бромистого этидия с лизатами лимфоцитов, инкубируемых в среде с различным содержанием дейтерия, с УФ облучением образцов по времени, равному 30 минутам

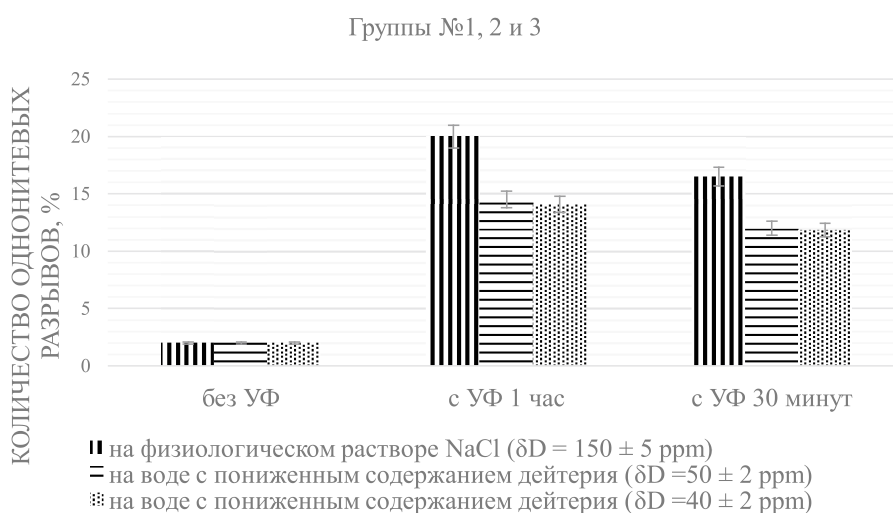


Рис. 4. Влияние обедненной по дейтерию воды на количество однонитевых разрывов в отсутствие и УФ облучении

Заключение

Следует учитывать, что клетки организма постоянно подвергаются воздействию множества генотоксических факторов как экзогенного, так и эндогенного происхождения и поэтому, эффективная работа систем сохранения и репарации ДНК является важным условием для их нормальной жизнедеятельности. Полученные результаты дают возможность предположить, что вода с низким содержанием дейтерия (50 и 40 ppm) действительно приводит к уменьшению однонитевых разрывов и как след-

ствие, к снижению вероятности мутаций клеток организма.

Список литературы

1. Барышев М.Г., Джимаков С.С., Долгов М.А., Дыдыкин А.С., Касьянов Г.И. О возможности применения воды с модифицированным изотопным составом и pH в мясной промышленности // Известия вузов Пищевая технология. – 2012. – № 2-3. – С. 42-44.
2. Басов А.А., Быков И.М., Федулова Л.В., Джимаков С.С., Барышев М.Г. Коррекция окислительного метаболизма в крови и гомогенатах тканей внутренних органов у лабораторных животных с помощью реакций изотопного D/H обмена // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2016. – Т. 11, № 1. – С. 103-107.

3. Гапеев А.Б., Фахранурова Л.И., Паскевич С.И., Ма-
нохин А.А., Гудков С.В., Симонова Н.Б., Вакштейн М.С.,
Храмов Р.Н. Уменьшение уровня химически-индуцирован-
ных повреждений ДНК в лейкоцитах крови крыс за счет
использования стратегии «полезное солнце» // Технологии
живых систем. – 2012. – Т. 9, № 6. – С. 16-25.
4. Джимаков С.С., Басов А.А., Барышев М.Г. Распределение
дейтерия в биологических жидкостях и внутренних органах: влия-
ние воды с пониженным содержанием дейтерия на градиент D/H
и процессы адаптации // ДАН. – 2015. – Т. 465, № 2. – С. 245-248.
5. Джимаков С.С., Басов А.А., Копытов Г.Ф., Каша-
ев Д.В., Соколов М.Е., Арцыбашева О.М., Шарапов К.С.,
Барышев М.Г. Применение ЯМР-спектроскопии для опре-
деления низких концентраций нерадиоактивных изотопов
в жидких средах // Известия высших учебных заведений.
Физика. – 2015. – Т. 58, № 7. – С. 47-52.
6. Джимаков С.С., Басов А.А., Федулова Л.В., Бы-
ков И.М., Ивлев В.А., Мелконян К.И., Тимаков А.А. Опре-
деление концентрации дейтерия в биологических жидкостях
с помощью ЯМР спектроскопии // Авиакосмическая и эко-
логическая медицина. – 2016. – Т. 50, № 3. – С. 42-47.
7. Джимаков С.С., Басов А.А., Федулова Л.В., Дыды-
кин А.С., Быков И.М., Арцыбашева О.М., Наумов Г.Н., Бар-
ышев М.Г. Коррекция метаболических процессов у крыс
при хроническом эндотоксикозе с помощью реакций изотоп-
ного (D/H) обмена // Известия РАН. Серия биологическая. –
2015. – № 5. – С. 518-527.
8. Самков А.А., Джимаков С.С., Барышев М.Г., Волчен-
ко Н.Н., Худокормов А.А., Самкова С.М., Карасева Э.В.
Влияние изотопного состава воды на выход биомассы
Rhodococcus erythropolis // Биофизика. – 2015. – Т. 60, № 1. –
С. 136-142.
9. Текуцкая Е.Е., Джимаков С.С., Басов А.А., Барыше-
ва Е.В., Федосов С.Р., Арцыбашева О.М. Оценка влияния
среды с различным изотопным D/H составом на репарацию
ДНК лимфоцитов // Медицинский вестник Северного Кав-
каза. – 2015. – Т. 10, № 3. – С. 287-292.
10. Патент РФ № 2438765, 10.01.2012.
11. Фролов В.Ю., Барышев М.Г., Болотин С.Н., Джи-
маков С.С. Способ получения биологически активной питье-
вой воды с пониженным содержанием дейтерия // Патент
РФ № 2438765. 2012. Бюл. № 1.