

УДК 576.356.2:539.1.047

ВЛИЯНИЕ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ НА УРОВЕНЬ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В КЛЕТКАХ ПРОРОСТКОВ *Allium cepa* L.

А. Я. Болсуновский^{1,*}, Д. В. Дементьев¹, Т. С. Фролова^{2,3},
Е. А. Трофимова¹, Е. М. Иняткина¹, С. А. Васильев⁴, О. И. Сеницына^{2,3}

Представлено академиком РАН А.Г. Дегерменджи 26.02.2019 г.

Поступило 04.03.2019 г.

Исследовали влияние γ -излучения на степень повреждений ядерной ДНК проростков лука (*Allium-test*) методом ДНК-комет. Впервые обнаружили разрывы ДНК в клетках проростков лука при малых дозах облучения ($\leq 0,1$ Гр). Для дозовой зависимости параметров повреждений ДНК отмечен нелинейный характер: линейный участок в области малых доз (до 0,1 Гр) и дозозависимое плато в диапазоне доз от 1 до 5 Гр. Полученные данные позволяют использовать метод ДНК-комет для оценки биологического действия малых доз γ -излучения на проростки *Allium cepa*.

Ключевые слова: *Allium-test*, проростки семян, гамма-облучение, метод ДНК-комет, хромосомные нарушения, микроядра, дозовая зависимость, малые дозы.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524892199-204>

Техногенные радионуклиды в окружающей среде являются источником облучения не только человека, но и организмов биоты. В большинстве случаев живые организмы подвергаются действию малых доз ионизирующего излучения. Гидробионты р. Енисей длительное время испытывают дополнительную дозовую нагрузку за счёт техногенных радионуклидов, в том числе в виде радиоактивных микрочастиц, в результате многолетних производственных сбросов в реку Горно-химического комбината (ГХК) ГК Росатом [1–3]. Для моделирования влияния γ -излучения радиоактивных частиц ранее нами были проведены лабораторные эксперименты с различными растительными и бактериальными биотестами [4, 5], которые показали их высокую чувствительность к γ -излучению в малых дозах [4, 5]. В качестве одного из биотестов нами использован луковый

биотест (*Allium-test*) [6], который выявил высокий уровень хромосомных нарушений в клетках проростков семян при малых дозах облучения.

Ионизирующая радиация индуцирует повреждения ДНК в результате как прямого энергетического действия, так и опосредованного (через образование свободных радикалов). Результатом физико-химического взаимодействия между ионизирующим излучением и ДНК являются одно- и двунитевые разрывы ДНК, апуриновые и апириимидиновые сайты, модификации оснований, сшивки ДНК и белков. Данные типы повреждений ДНК могут быть обнаружены при использовании геле-электрофореза индивидуальных ядер (метод ДНК-комет — Comet assay) [7, 8]. В большинстве случаев метод ДНК-комет использован для исследования клеток животных и человека [7, 8]. Однако некоторые исследования были посвящены применению метода ДНК-комет в растительных системах для оценки химической токсичности [8, 9]. В отдельных работах метод ДНК-комет применяли для оценки радиационной токсичности, но при этом использовали высокие дозы облучения (десятки и сотни грей) [8, 10–13]. Только в одной работе [13] оценивали генотоксичность малых доз облучения (от радиоактивных почв) *Allium-test* и метода ДНК-комет, но авторы не привели дозы облучения растений.

Цель настоящей работы — оценить влияние γ -излучения, в том числе в малых дозах, на уровень повреждений ДНК клеток проростков лука при использовании *Allium-test*.

¹ Институт биофизики

Федерального исследовательского центра

“Красноярский научный центр

Сибирского отделения Российской Академии наук”,
Красноярск

² Федеральное исследовательское учреждение

“Институт цитологии и генетики Сибирского отделения

Российской Академии наук”, Новосибирск

³ Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет

⁴ Научно-исследовательский институт

медицинской генетики Томского национального

исследовательского медицинского центра

Российской Академии наук, Томск

*E-mail: radecol@ibp.ru

В экспериментах по биотестированию ионизирующего излучения использовали семена репчатого лука (*Allium cepa* L.) сорта Штуттгартен ризен. Семена предварительно проращивали в полипропиленовых контейнерах на фильтровальной бумаге, смоченной в дистиллированной воде, и для эксперимента отбирали проростки длиной 2–3 мм. Проростки лука облучали источником γ -излучения (^{137}Cs активностью 14 ГБк) в Институте ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН (Новосибирск) в течение 24 ч. Всего было проведено четыре эксперимента в 2016 г. В опытах поглощённая доза для проростков лука составила 0,02; 0,05; 0,1; 1; 3 и 5 Гр, что соответствовало мощности дозы 0,8; 2,1; 4,2; 42; 125 и 208 мГр/ч. Значения мощности доз γ -излучения определялись расстоянием проростков от источника, были получены расчётным методом на основании паспортной мощности экспозиционной дозы для источника ^{137}Cs и проверены прямыми измерениями дозиметром ДКС-АТ1123 (НПП “Доза”, Россия). Отрицательным контролем служили необлучённые проростки (мощность дозы в контроле 0,002 мГр/ч), для положительного контроля проростки инкубировали в 0,5%-м растворе H_2O_2 в течение 1,5 ч. Для облучения проростки выкладывали в прозрачные полипропиленовые контейнеры на ложе из двух слоёв фильтровальной бумаги, смоченной в дистиллированной воде. Для каждого уровня облучения и контроля использовали по 15 проростков. Эксперименты проводили при температуре 18–21 °С без освещения.

Оценку повреждений ДНК клеток проростков по методу ДНК-комет проводили согласно методике [9]. От контрольных проростков и после облучения отрезали кончики корня длиной 0,3–0,5 мм, помещали в 300 мкл холодного трис-НСI буфера

(400 мМ, рН 7,5) и тщательно измельчали. Затем 200 мкл полученной суспензии добавляли к 0,6 мл легкоплавкой агарозы (1%-я легкоплавкая агароза на натрий-фосфатном буфере) при 37 °С, тщательно перемешивали и наносили по 200 мкл на предварительно подготовленные предметные стёкла (тонкий слой 1%-й тугоплавкой агарозы на дистиллированной воде, высушенный в течение 12 ч), накрывали покровным стеклом и выдерживали на льду в течение 3–4 мин, затем покровные стёкла убрали. Готовые препараты помещали в электрофорезную камеру со свежеприготовленным буфером (1 мМ Na_2EDTA , 300 мМ NaOH , рН > 13) при температуре 4 °С, выдерживали 15 мин. Электрофорез проводили также при 4 °С в течение 30 мин (40 В, 125 мА, 2 Вт). Затем стёкла промывали трижды в нейтрализующем буфере (400 мМ трис-НСI, рН 7,5), окрашивали бромистым этидием (20 мкг/мл) по 100 мкл на стекло в течение 15 мин, отмывали от избытков красителя в холодной дистиллированной воде в течение 15 мин.

Анализ результатов проводился на флуоресцентном микроскопе AxioStar (“Carl Zeiss”) с использованием программного обеспечения Zen (“Carl Zeiss”). На каждую точку эксперимента учитывалось не менее 100 комет. На рис. 1 приведены фотографии необлученных ядер (а – контроль) и повреждённых облучением (б – опыт, ДНК-кометы) ядер клеток лука. Обработка данных проведена с помощью программы CASPLab (<http://casplab.com/>), и результаты представлены в виде параметров:

- 1) ДНК в голове комет, %;
- 2) ДНК в хвосте комет, %;
- 3) Момент хвоста комет (отн. ед.) — произведение длины кометы от середины головы до середины хвоста и содержания ДНК в хвосте кометы.

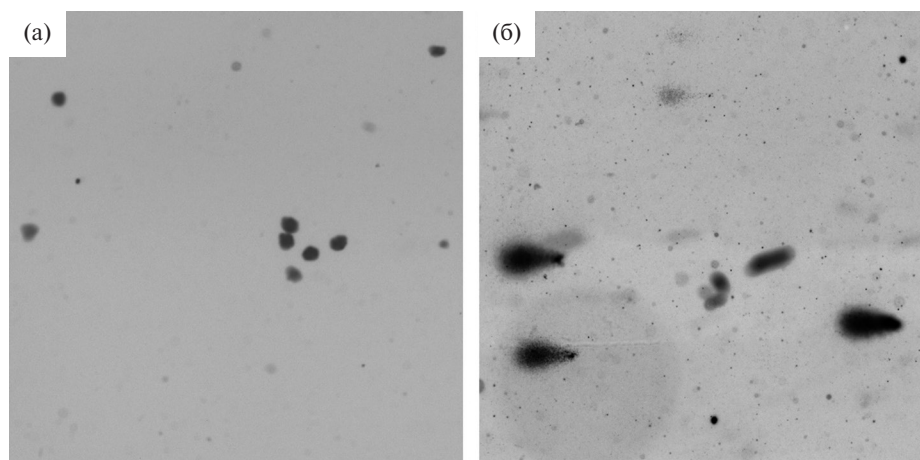


Рис. 1. Фотографии неповреждённых ядер клеток лука (а – контроль) и повреждённых ядер (б – опыт, ДНК-кометы) после γ -облучения проростков.

Полученные экспериментальные данные анализировали методами вариационной статистики с использованием пакета STATISTICA 7.0. Статистическую значимость отличий оценивали с помощью критерия Стьюдента.

Используемая методика [9] позволяет оценивать разрывы в составе ДНК ядер лука суммарно (одно- и двунитевые разрывы ДНК). Во всех четырёх проведённых экспериментах мы обнаружили, что накопление суммарных повреждений ДНК в составе ядер проростков лука имеет нелинейный характер в используемом диапазоне доз γ -излучения (от фоновой до 5 Гр). Из представленных данных на рис. 2а видно, что параметры повреждений ДНК (ДНК в хвосте комет и Момент хвоста комет) возрастают

практически линейно с увеличением дозы облучения и достигают своих максимальных значений при дозе облучения 0,02 Гр и выше. При этом в области малых доз облучения (0,02–0,1 Гр) параметры повреждений ДНК достоверно отличаются от параметров контрольных растений без облучения.

С ростом дозы γ -облучения выше 1 Гр не происходит дальнейшего увеличения суммарного содержания повреждений ДНК в ядрах проростков, и даже наблюдается некоторое снижение уровня повреждений (рис. 2а). Это снижение параметров повреждения ДНК наиболее выражено для Момент хвоста комет (со 171 до 51 отн. ед.), чем для ДНК в хвосте комет (с 73 до 52%). Следует заметить, что в литературе параметр ДНК в хвосте комет считается более

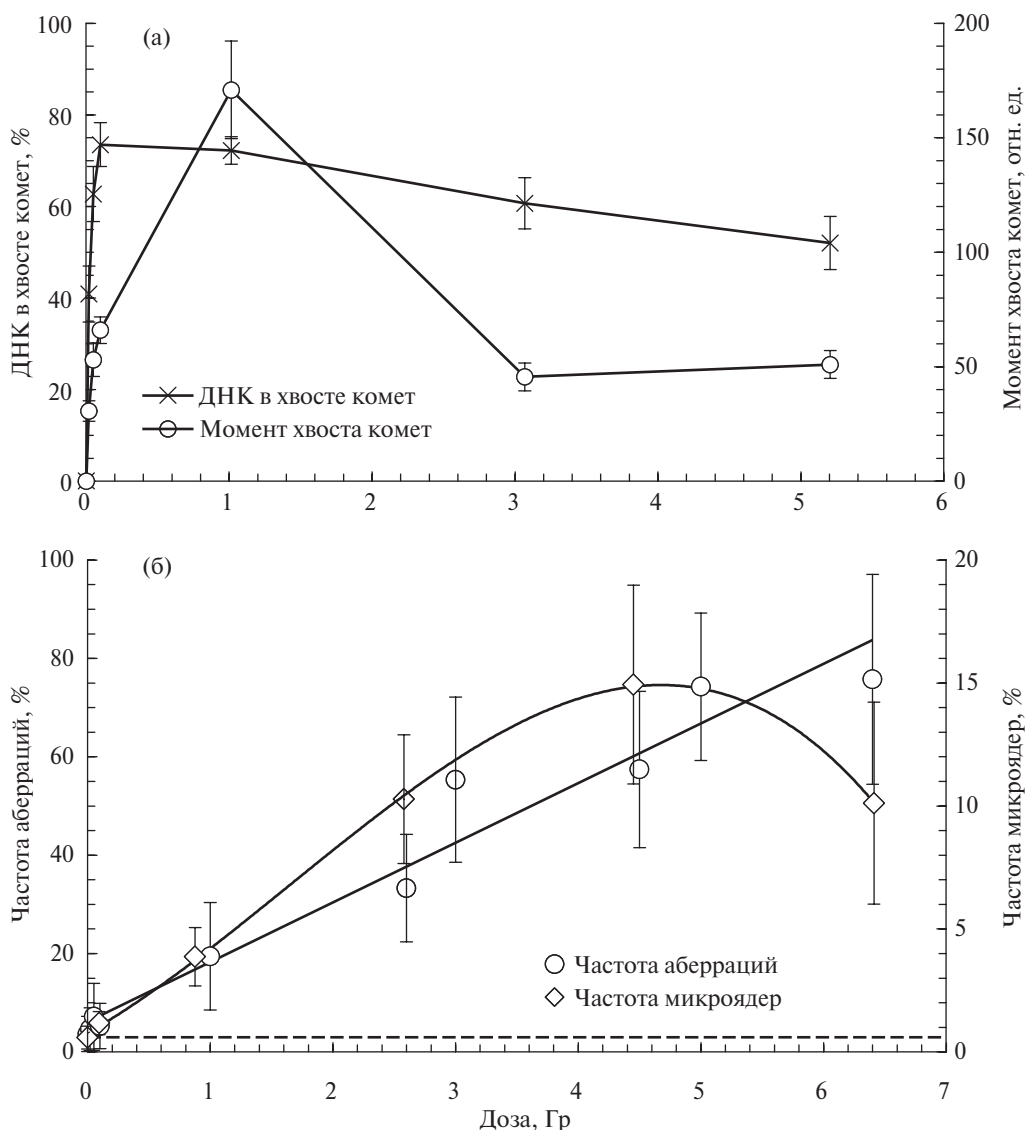


Рис. 2. Дозовые зависимости параметров повреждений ДНК (ДНК в хвосте комет и Момент хвоста комет) (а), частоты хромосомных aberrаций и частоты встречаемости микроядер (б) в клетках проростков лука. Штриховая линия — контроль.

надёжным, чем параметр Момент хвоста комет, поскольку при расчёте Момента хвоста комет не учитывается изменение ширины хвоста комет [8]. Полученные максимальные значения параметров повреждений ДНК (ДНК в хвосте комет $73 \pm 5\%$ и Момент хвоста комет 171 ± 21 отн. ед.) при γ -облучении близки к значениям этих параметров для положительного контроля, когда проростки инкубировали в 0,5%-м растворе H_2O_2 . Так, для положительного контроля параметры повреждений ДНК (ДНК в хвосте комет $80 \pm 5\%$ и Момент хвоста комет 151 ± 17 отн. ед.).

Ранее в экспериментах 2016–2017 гг. по γ -облучению проростков лука мы анализировали цитогенетические показатели (хромосомные нарушения и микроядра) в апикальных клетках корней при поглощённых дозах до 10 Гр [6]. Как следует из полученных данных, с ростом дозы облучения до 5 Гр регистрируется линейное увеличение частоты хромосомных нарушений (рис. 2б) и частоты встречаемости микроядер (рис. 2б) в апикальных клетках проростков лука. При облучении в малых дозах ($\leq 0,1$ Гр) величина общей частоты хромосомных нарушений и встречаемости микроядер была достоверно выше таковой в необлучённых контрольных пробах [6]. Зарегистрированный нами факт повреждений ДНК в клетках проростков лука при малых дозах (рис. 2а) является дополнительным аргументом в пользу доказательства влияния малых доз γ -облучения наряду с хромосомными нарушениями и микроядрами.

Однако характер дозовых кривых для параметров повреждений ДНК, а также частоты микроядер и хромосомных нарушений различался существенно при облучении в дозах более 0,02–1 Гр. Так, в диапазоне доз от 1 до 5 Гр параметр повреждений ДНК (ДНК в хвосте комет) почти не зависел от поглощённой дозы, т.е. наблюдалось плато на дозовой зависимости, в то время как частота микроядер и хромосомных нарушений линейно возрастала (рис. 2).

Как уже отмечено, в работе [13] оценивали генотоксичность радиоактивных почв с использованием *Allium*-test и метода ДНК-комет. Авторы показали, что при увеличении содержания радия-226 в почве в 20 раз — с 1 до 20 кБк/кг — уровень повреждений ДНК корней лука (Момент хвоста комет) возрастает всего в два раза. Авторы не привели дозы облучения растений за счёт радиоактивных почв, но очевидно, что дозы будут малые. Авторами [13] приведена линейная дозовая зависимость параметра Момент хвоста комет корней лука в диапазоне доз гамма-

облучения от 5 до 50 Гр (мощность дозы 1440 Гр/ч). Различия в характере дозовых зависимостей повреждений ДНК в наших экспериментах (нелинейная зависимость) и данные отмеченной выше работы (линейная зависимость) могут быть объяснены характером и длительностью облучения. Так, в наших экспериментах облучение корней лука было хроническим при мощности дозы не более 0,1–0,2 Гр/ч, в то время как в работе [13] — острое облучение при мощности дозы 1440 Гр/ч. В работе [10] при гамма-облучении листьев *Petunia* было показано, что при низкой мощности дозы облучения (0,33 Гр/мин) регистрируется меньше повреждений ДНК, чем при высокой мощности дозы (5,15 Гр/мин). При этом поглощённая доза была одинаковой (50 Гр) в обоих случаях.

В работе [12] также приведена нелинейная дозовая зависимость повреждений ДНК при γ -облучении корней растения *Arabidopsis* в диапазоне поглощённых доз от 3 до 48 Гр и низкой мощности дозы облучения (0,1 Гр/ч) в отдельные периоды. Авторы показали насыщение дозовой кривой повреждений ДНК начиная с дозы 3–6 Гр, и при этом пороговый уровень ДНК в хвосте комет составил 40%. В этой работе не использовали дозы облучения менее 3 Гр и отсутствовали значения параметров повреждений ДНК. Данные работы [12] согласуются с обнаруженным нами нелинейным характером зависимости повреждений ДНК от поглощённой дозы при хроническом гамма-облучении с низкой мощностью дозы (рис. 2). Возможно, что при низкой мощности дозы облучения клетки могут эффективно (но не обязательно правильно) репарировать возникающие разрывы ДНК. При этом наличие нерепарированных двунитевых разрывов ДНК может приводить к запуску клеточной гибели [14]. Вероятно, уровень повреждений ДНК в клетках, если есть время на репарацию повреждений ДНК, ограничен сверху определённым порогом, после которого клетки гибнут. Возможно, что таким пороговым уровнем повреждений ДНК является полученное нами максимальное значение ДНК в хвосте комет $73 \pm 5\%$ (рис. 2) или максимальное значение ДНК в хвосте комет 40% в работе [12]. Напротив, хромосомные aberrации и микроядра являются следствием в первую очередь неправильной репарации двунитевых разрывов ДНК. Их накопление в клетках уже не фиксируется методом ДНК-комет, а гибель клеток с подобными повреждениями требует прохождения одного или нескольких делений. В результате этого частота хромосомных aberrаций и микроядер накапливается с увеличением накопленной

поглощённой дозы и может линейно возрастать, как в нашем случае, в определённом диапазоне доз.

Таким образом, используемый нами метод ДНК-комет для оценки повреждений ДНК ядер проростков лука показал увеличение параметров повреждений ДНК (ДНК в хвосте комет и Момент хвоста комет) в диапазоне доз γ -облучения от 0,02 до 5 Гр по сравнению с контролем. Впервые для проростков лука установлено, что в области малых доз облучения ($\leq 0,1$ Гр) параметры повреждений ДНК достоверно отличаются от параметров растений без облучения. Для дозовой зависимости параметра повреждений ДНК (ДНК в хвосте комет) отмечен нелинейный характер: линейный участок в области малых доз (до 0,1 Гр) и дозозависимое плато в диапазоне доз от 1 до 5 Гр. Ранее в этом диапазоне доз облучения регистрировалась линейная зависимость частоты микроядер и хромосомных нарушений в клетках лука. Возможным объяснением нелинейных эффектов облучения при дозах 1–5 Гр может быть существование порогового уровня повреждений ДНК, обусловленного репарацией разрывов при низкой мощности дозы хронического облучения. Факт повреждений ДНК в клетках проростков лука при малых дозах является дополнительным аргументом (наряду с хромосомными нарушениями и микроядрами) в доказательство влияния малых доз γ -облучения на растения (*Allium*-test).

Благодарности. Авторы благодарят М.В. Петриченко (ИЯФ СО РАН) за помощь в проведении экспериментов по облучению проростков лука.

Источники финансирования. Работа по оценке повреждений в составе ДНК ядер проростков лука выполнена на базе ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН, финансируемого по теме НИР ГЗ ИЦиГ СО РАН. Работа выполнена при частичной поддержке совместного гранта РФФИ и ККФН № 18–44–240001.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болсуновский А.Я., Суковатый А.Г. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2004. Т. 44. № 3. С. 393–398.
2. Bolsunovsky A. // Chem. Ecol. 2010. V. 26. № 6. P. 401–409.
3. Bolsunovsky A., Melgunov M., Chuguevskii A., Lind O.C., Salbu B. // Sci. Repts. 2017. № 7. Article number: 11132. P. 1–10.
4. Bolsunovsky A., Frolova T., Dementyev D., Sinityna O. // Ecotoxic and Environ. Safety. 2016. V. 134. Pt 1. P. 233–238.
5. Болсуновский А.Я., Дементьев Д.В., Трофимова Е.А., Зотина Т.А. // ДАН. 2017. Т. 475. № 1. С. 113–119.
6. Болсуновский А.Я., Дементьев Д.В., Трофимова Е.А., Иняткина Е.М., Кладко Ю.В., Петриченко М.В. // ДАН. 2018. Т. 481. № 1. С. 99–103.
7. Olive P.L. // Int. J. Radiation Biology. 1999. V. 75. № 4. P. 395–405.
8. Collins A.R. // Molecular Biotechn. 2004. V. 26. P. 249–261.
9. Gichner T., Patková Z., Száková J., Demnerová K. // Mutation Research. 2004. V. 559. P. 49–57.
10. Dona M., Ventura L., Macovei A., Confalonieri M., Savio M., Giovannini A., Carbonera D., Balestrazzi A. // J. Plant Physiology. 2013. V. 170. P. 780–787.
11. Koppen G., Cerda H. // LWT-Food Science and Technology. 1997. V. 30. P. 452–457.
12. Tae Ho Ryua, Jin Kyu Kima, Jeong-II Kimb, Jin-Hong Kima // J. Environ. Radioactivity. 2018. V. 181. P. 94–101.
13. Saghizadeh M., Gharaati M.R., Mohammadi Sh., Ghiassi-Nejad M. // J. Environ. Radioactivity. 2008. V. 99. P. 1698–1702.
14. Torudd J., Protopopova M., Sarimov R., Nygren J., Eriksson S., Markova E., Chovanec M., Selivanova G., Belyaev I.Y. // Int. J. Radiat. Biol. 2005. V. 81. P. 125–138.

EFFECTS OF GAMMA-RADIATION ON DNA DAMAGE IN ONION (*Allium cepa* L.) SEEDLINGS

A. Ya. Bolsunovsky¹, D. V. Dementyev¹, T. S. Frolova^{2,3}, E. A. Trofimova¹,
E. M. Iniatkina¹, S. A. Vasilyev⁴, O. I. Sinitsyna^{2,3}

¹*Institute of Biophysics of the Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences", Krasnoyarsk, Russian Federation*

²*Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation*

³*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation*

⁴*Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation*

Presented by Academician of the RAS A.G. Degermendzhy February 26, 2019

Received March 4, 2019

The effect of γ -radiation on the level of nuclear DNA damage in onion seedlings (*Allium*-test) was studied using the comet assay. DNA breaks were first found in cells of onion seedlings exposed to low-dose radiation ($\leq 0,1$ Gy). Dose dependence of DNA damage parameters showed nonlinear behavior: a linear section in the low-dose region (below 0,1 Gy) and a dose-independent plateau in the dose range between 1 and 5 Gy. Thus, the comet assay can be used to estimate the biological effects of low-dose gamma-radiation on *Allium cepa* seedlings.

Keywords: *Allium*-test, germinating seeds, Comet assay, gamma-radiation, chromosomal aberrations, micronuclei, the dose-response curve, low doses.