

Н. Г. НОР-АРЕВЯН, Ц. М. АВАКЯН, А. К. МАТЕВОСЯН

К ВОПРОСУ О ПРИМЕНЕНИИ МЕТОДА СОПОЛИМЕРИЗАЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЙ ПРИ ОБЛУЧЕНИИ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

При изучении начальных процессов, происходящих под действием ионизирующих излучений в биологических объектах, многие авторы обращают большое внимание на физико-химические реакции, идущие с участием свободных радикалов (СР) [1, 3, 7, 12]. Изучение СР состояний в биологических системах в настоящее время ведется, в основном, с помощью электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).

Однако использование метода ЭПР при такого рода исследованиях не дает исчерпывающей информации о СР, возникающих при облучении. Так, методом ЭПР невозможно учесть короткоживущие активные СР, которые возникают в момент облучения. Низкая концентрация таких активных СР, а также наличие большого количества воды в биообъектах, делает применение метода ЭПР ограниченным при решении многих радиобиологических вопросов. С целью преодоления вышеуказанных трудностей Ю. П. Козловым и Б. Н. Тарусовым [2] была предложена совершенно новая методика по определению СР. В основу этого метода было положено получение привитых сополимеров на основе взаимодействия молекул акриламида с макромолекулами биополимера.

Ввиду того, что данная методика с успехом применялась на низших растениях [9], животных [4—6, 10] и их гомогенатах [11], было также интересно проделать подобные эксперименты на высших растениях.

В связи с вышеизложенным, а также принимая во внимание большую роль кислорода в выяснении механизма первичных радиационных процессов, в настоящей работе делается попытка найти связь между количеством СР состояний и эффективностью действия ионизирующих излучений при различных давлениях кислорода.

Методика и экспериментальная часть. Опыты ставились на корешках трехдневных проростков конских бобов и пятидневных проростках пшеницы. В первой серии экспериментов с конскими бобами подбирались корешки одинаковых размеров в количестве по 32 на вариант и погружались до облучения в кристаллизаторы, заранее наполненные раствором акриламида, меченого C^{14} . Объем кристаллизатора 400 мл. Общая активность на сосуд 10 μ С. Через 4 часа корешки проростков облучались γ -лучами ($p=40$ р/мин.) в специальной кислородной камере при следующих давлениях кислорода: 0 (1 атм. азота), 0,2 (воздух) и 10 атм. Контролем служили необлученные корешки проростков конских бобов.

После соответствующего облучения корешки отделялись от семян, отмывались, а затем на трое суток погружались в литровые сосуды, наполненные отстойной водой. Вода в сосудах менялась 3 раза в день. Данная процедура проделывалась для того, чтобы дать возможность непрореагировавшему акриlamиду вымыться из клеток [10]. По истечении трех суток корешки высушивались, растирались, а затем из них готовились препараты. Активность измерялась с помощью счетчика Т-25 БФЛ на установке Б-2. В работе использовался метод толстослойных препаратов. Толщина слоя навески превышала 20 мг/см^2 , что соответствовало слою полного самопоглощения (табл. 1).

Таблица 1

Зависимость количества меченого акриlamид, находящегося в корешках бобов, от давлений кислорода, присутствующего в момент облучения (в имп/мин.).

Варианты	Контроль	0 (азот) +250 р	0,2 (воздух) +250 р	10 атм +250 р
Активность	2112 ± 120	1860 ± 111	2197 ± 108	1981 ± 154

Согласно литературным данным, акриlamид, проникающий в клетки, прочно прививается к биополимерам. Этот медленно протекающий процесс резко ускоряется при облучении γ -лучами [2, 4—6, 9—11]. Как видно из наших экспериментов, подобного ускорения процесса установить не удалось.

Во второй серии опытов измерение активности производилось не в целых корешках, как это мы делали до этого, а только в их кончиках. Такой подход в исследовании данного вопроса диктовался тем, что основные процессы, ответственные за радиобиологический эффект, протекают именно в кончике корешка. Измерение активности производилось с помощью гистоавтордиографической методики [10]. Результаты данной серии опытов представлены в табл. 2.

Таблица 2

Зависимость количества меченого акриlamид в корешках конских бобов от концентраций кислорода, присутствующего в момент облучения различными дозами

Варианты	Д о з а в р			
	0	100	250	400
0 (азот)	—	326 ± 28	288 ± 26	—
0,2 атм (воздух) . .	222 ± 21	231 ± 20	241 ± 25	266 ± 21
10 атм (кислород) . .	—	210 ± 19	256 ± 19	—

Как видно из данных табл. 2, нам и в этом случае не удалось найти существенной разницы между облученными и контрольными вариантами. Отсутствие эффекта в опытах с конскими бобами побудило нас пред-

принять исследование на новом объекте—корешках проростков пшеницы. Такая замена объекта диктовалась также соображениями и другого рода: в отличие от корешков *Vicia faba* корешки пшеницы намного тоньше, что должно было, по нашему мнению, создавать лучшие условия для вымывания непрореагировавшего акриламида.

Согласно литературным данным полное вымывание свободного акриламида из облученных и контрольных тканей животных является необходимым условием для успешного использования методики по определению СР состояний [10]. В связи с вышеизложенным, в третьей серии опытов исследовалась кинетика выделения радиоактивного акриламида из облученных (3500—4000 р) и контрольных корешков пшеницы в различные сроки после облучения. Методика измерения активности такая же, как и в первом опыте с конскими бобами. Основная часть корешков фиксировалась в кипящей воде. Однако имелись также два варианта, где измерялась активность без предварительной фиксации. Результаты этой серии представлены в табл. 3.

Таблица 3

Кинетика вымывания меченого акриламида в различные моменты времени после облучения корешков пшеницы (в имп/мин.).

Варианты	Время в сутках					
	0		1		5	
	не фиксированные	фиксированные	не фиксированные	фиксированные	не фиксированные	фиксированные
Контроль	—	1035±80	—	917±42	962±61	682±81
Облученные	—	1005±72	—	—	957±71	704±47

Как и в предыдущих опытах, нам и на этот раз не удалось установить какой-либо разницы между облученными и контрольными вариантами. Из данных таблицы однако следует, что в течение времени вода вымывает незначительную часть активности. При фиксации в кипящей воде в течение 30 мин. эта потеря увеличивается до 30% от исходной.

Так как в литературе имеются данные о влиянии концентрации мономеров на процент прививки при облучении [8], нами было исследовано также и влияние этого фактора в интересующем нас вопросе.

Данные опытов, где корешки до, в момент и после облучения дозой 3500—4000 р выдерживались в растворе меченого акриламида с концентрациями 0,003%, 0,01% и 0,1% приведены в табл. 4. Концентрации выше 0,1% оказывали токсическое действие на рост и развитие проростков пшеницы. Время пребывания корешков в растворе с указанными концентрациями—4 часа (1,5+1+1,5). Фиксация корешков кипятком производилась через 15 суток после их пребывания в проточной воде.

Результаты опытов, где корешки выдерживались в растворе меченого акриламида (0,05%) в течение 2 ч. (0,5+1+0,5), приводятся в табл. 5.

Т а б л и ц а 4

Зависимость количества меченого акриламида, находящегося в облученных корешках пшеницы, от концентрации акриламида (в имп/мин.).

Варианты	Концентрация акриламида		
	0,003%	0,01%	0,1%
Контроль	452±33	478±45	547±19
Облучение 3500—4000 р.	473±26	478±12	648±33

Т а б л и ц а 5

Зависимость количества меченого акриламида, находящегося в облученных корешках пшеницы, от способа фиксации корешков (в имп/мин.).

Варианты	Ф и к с а ц и я		
	абсолютный спирт	ацетон	раствор Карнуа
Контроль	477±65	518±17	458±8
Облучение 3500—4000 р.	599±20	469±35	465±24

Доза облучения и время пребывания корешков в проточной воде такая же, как и в предыдущем случае. Фиксация производилась в кипящем ацетоне, абсолютном спирте и растворе Карнуа.

В результате проведенных экспериментов мы приходим к убеждению, что акриламид, проникший в клетку, не является метаболически инертным, как это было показано на животных и низших растениях.

В связи с вышеизложенным становится ясным, что меченый акриламид не является пригодным соединением для определения свободнорадикальных состояний по методике Ю. П. Козлова и Б. Н. Тарусова [2] на высших растениях.

Лаборатория биофизики

Института земледелия АрмССР

г. Эчмиадзин

Поступило 6.IV 1967 г.

Ն. Գ. ՆՈՐ-ԱՐԵՎՅԱՆ, Ծ. Մ. ԱՎԵՐԵԱՆ, Ա. Կ. ՄԱՐԵՎՈՍՅԱՆ

ՀԱՍՈՍԳԱՅԹԱՀԱՐՎԱԾ ԲԱՐՁՐԱԿԱՐԳ ԲՈՒՅՍԵՐԻ ՄՈՏ ԱԶԱՏ
ՌԱԴԻՈԱԿՏԻՆ ՎԻՃԱԿԵՐԻ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ՍՈՊՈԼԻՄԵՐԻԶԱՑԻԱՅԻՆ
ՄԵԹՈԴԻ ՄԻՋՈՑՈՎ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Կենսաբանական օբյեկտներում իոնացնող ճառագայթների ազդեցության տակ տեղի ունեցող երևույթներն ուսումնասիրելու համար մեծ նշանակություն ունեն այն ռեակցիաները, որոնք ընթանում են ԱՌ-ի (ազատ ռադիկալների) մասնակցությամբ:

Վերջին տարիներս ԱՌ-ի վիճակի ուսումնասիրությունը կատարվում է հիմնականում էՊՌ-ի մեթոդով, սակայն ԱՌ-ի կյանքի փոքր տևողությունը, ինչպես նաև կենսահիմքում մեծ քանակությամբ ջրի առկայությունը էլեկտրոնային պարամագնիսային ռեզոնանսի մեթոդը դարձնում են անընդունելի:

Նշված թերություններից զերծ է Յու. Պ. Կոզլովի և Բ. Ն. Տարուսովի [2] առաջարկած բուրոնովին նոր մեթոդը, որի հիմքում ընկած է մոնոմերի՝ նշված առումով ակրիլամիդի և պոլիմերի փոխազդեցության հետևանքով սոպոլիմերների ստացումը:

Այս մեթոդը հնարավորություն է տալիս որոշելու ԱՌ-ի վիճակը նորմալ գործող բջջում՝ ջրային պայմաններում, ինչպես նաև որոշելու նրանց քանակությունը ճառագայթահարման ժամանակ և ճառագայթահարումից հետո:

Մեր աշխատանքում մենք նպատակ ենք դրել, օգտվելով այս մեթոդից, ուսումնասիրել ճառագայթահարման ժամանակ առաջացող ԱՌ-ի վիճակը բարձրակարգ բույսերի մոտ: Ուսումնասիրությունները կատարել ենք բակլայի, ինչպես նաև «Արտաշատի 42» սորտի ցորենի կուլտուրաների վրա, օգտագործելով հիստոլոգիկական մեթոդաֆիզիկ և ռադիոմետրիկ մեթոդները:

Գրականության տվյալների համաձայն, ակրիլամիդը թափանցելով բջջի մեջ, ամուր հյուսակցվում է բիոպոլիմերի հետ:

Այս դանդաղ ընթացող պրոցեսը պետք է զգալիորեն արագանար γ -ճառագայթներով ազդելիս: Մեր փորձերում այդ հայտնաբերել չի հաջողվել:

Տվյալ աշխատությամբ մենք հայտնաբերեցինք, որ բարձրակարգ բույսերի մեջ թափանցած նշված C^{14} առումով ակրիլամիդը, ի տարբերություն կենդանի օրգանիզմների և ստորակարգ բույսերի, ակտիվորեն չուրացվում է նրա կողմից, որը և այս մեթոդը բարձրակարգ բույսերի համար դարձնում է ոչ կիրառելի:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Инграм Д. Электронный парамагнитный резонанс в свободных радикалах, М., ИЛ, 1961.
2. Козлов Ю. П., Тарусов Б. Н. Тр. МОИПа Свободнорадикальные процессы в биологических системах. Изд-во Наука, М., стр. 31, 1966.
3. Мюллер А. и Циммер К. Свободные радикалы в биологических системах, ИЛ, М., 1963.
4. Тараненко Г. А., Козлов Ю. П., Бурлакова Е. В. Научные доклады высшей школы (сер. биол.), 3, 1966.
5. Тараненко Г. А. Бюлл. МОИПа, отд. биол., 1, 1966.
6. Тараненко Г. А. Автореферат канд. диссертации, М., МГУ, 1965.
7. Тарусов Б. Н. Первичные процессы лучевого поражения, Госатомиздат, 1962.
8. Тарусов Б. Н., Козлов Ю. П. ДАН СССР, 140, 3, 709, 1961.
9. Тарусов Б. Н., Козлов Ю. П., Кольс О. Р., Лимаренко И. М. Тр. МОИПа. Свободнорадикальные процессы в биологических системах, Изд-во Наука, М., стр. 218, 1966.
10. Тарусов Б. Н., Козлов Ю. П., Лимаренко И. М., Се Бао-шень. Тр. МОИПа. Свободнорадикальные процессы в биологических системах, Изд-во Наука, М., стр. 44, 1966.
11. Тарусов Б. Н., Козлов Ю. П., Уртилэ С. Тр. МОИПа. Свободнорадикальные процессы в биологических системах. Изд-во Наука, М., стр. 47, 1966.
12. Циммер К. Проблема количественной радиобиологии, М., ИЛ, 1961.