

Jak chránit DNA před zářením

G. Špeldová¹, M. Hyblová², F. Randák³, L. Melcher⁴

¹Gymnázium Jiřího z Poděbrad, Studentská 166, 290 01 Poděbrady

²Gymnázium Česká a Olympijských nadějí, Česká 64, 370 21 Č.
Budějovice

³Sportovní gymnázium Kladno, Plzeňská 3103, 272 01 Kladno

⁴Gymnázium Christiana Dopplera, Zborovská 45, 150 00 Praha 5

¹gspeldova@seznam.cz, ²marie.hyblova2@seznam.cz,

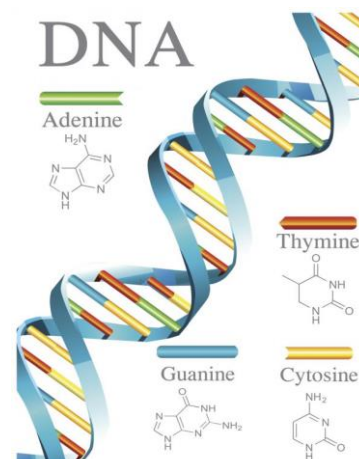
³filip.valdek@seznam.cz, ⁴lmelcher1@gmail.com

Abstrakt:

V této vědecké práci jsme ověřovali radioprotektivní schopnost různých látek chránit deoxyribonukleovou kyselinu (DNA) před nepřímým účinkem ionizujícího záření, přičemž jsme si pro experiment vybrali ethanol a 50% moravskou slivovici. Vzorky DNA s potenciálním radioprotektivem o různých koncentracích jsme vystavili gama záření ⁶⁰Co. Změřili jsme poškození DNA v jednotlivých vzorcích. Z našich výsledků vyplývá, že obě vybrané látky mají schopnost chránit DNA před nepřímými účinky ionizujícího záření.

1 Úvod

V případě ozáření buňky (základní stavební jednotky živých organismů) ionizujícím zářením (IZ) dochází k poškození všech jejích částí. Největšímu poškození podléhá zejména její nejcitlivější část, a to DNA. Poruchy jsou způsobeny přímým či nepřímým účinkem záření. Přímým účinkem rozumíme přímou ionizaci makromolekuly DNA. Nepřímý účinek je způsoben volnými radikály, které vznikají zasažením molekul H₂O ionizujícím zářením. Pravděpodobnost přímého zasažení DNA je velmi malá. Budeme se tedy zabývat účinkem nepřímým, který lze modifikovat různými chemikáliemi.



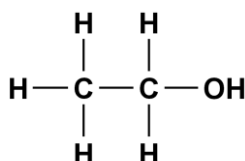
Obr. 1 Struktura DNA s dusíkatými bázemi

2 Experiment

Experiment proběhl v laboratoři Ústavu jaderné fyziky AV ČR. S velkou pečlivostí a přesností bylo připraveno 20 vzorků, na kterých následně proběhlo testování.

Materiály a metody

V roztoku jsme ozařovali plasmidovou DNA (plasmid pBR322), což je kruhová molekula DNA vyskytující se především v cytosolu některých bakterií. Každý vzorek o objemu 10 μ l obsahoval 90ng DNA v 100mM fosfátovém pufru. Jako vychytávače (scavengery) volných radikálů jsme použili ethanol a jeho 50% roztok, komerčně nazývaný slivovice. Vybrali jsme různé koncentrace vychytávače uvedené v tabulce.



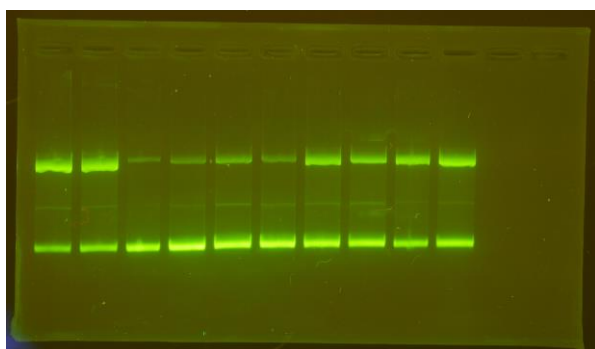
Obr. 2 Strukturální vzorec ethanolu

Ethanol		
Vzorek	Koncentrace	Zředěnost
1	1M	5x
2	1M	5x
3	0,1M	50x
4	0,1M	50x
5	0,01M	500x
6	0,01M	500x
7	0,001M	5000x
8	0,001M	5000x
9	0M	
10	0M	

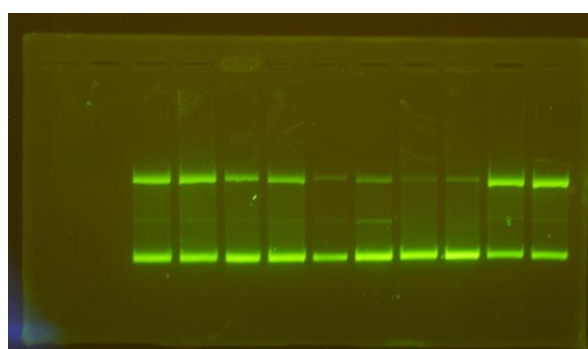
Slivovice 50%		
Vzorek	Koncentrace	Zředěnost
1	1M	2,5x
2	1M	2,5x
3	0,1M	25x
4	0,1M	25x
5	0,01M	250x
6	0,01M	250x
7	0,001M	2500x
8	0,001M	2500x
9	0M	
10	0M	

Tab. 1,2 Koncentrace vychytávačů v jednotlivých vzorcích

Vzorky byly vystaveny účinkům IZ ^{60}Co (absorbovaná dávka ve vzorcích byla 10Gy) a poté byly aplikovány do 1% agarového gelu. Abychom oddělili různé konformace DNA, užili jsme elektroforetické metody. Jedná se o metodu založenou na rozdílné rychlosti migrace různě poškozené DNA ve stejnosměrném elektrickém poli. Do gelu jsme přidali fluorescenční barvivo SYBR Green I, které umožňuje pozorovat rozmístění DNA ve vzorcích pod UV zářením.



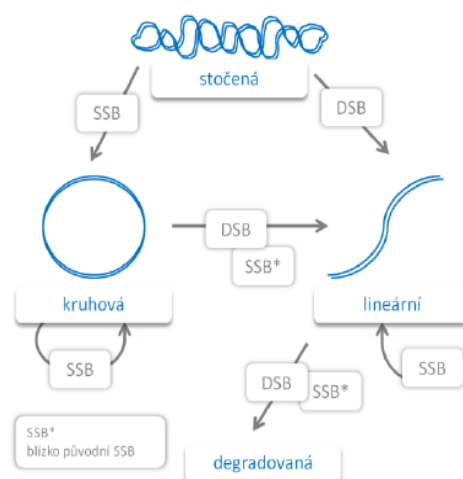
Obr.3 Výsledný gel s ethanolem pod UV



Obr.4 Výsledný gel se slivovicí pod UV

Výsledky

Analýzou obr. 3 a obr. 4 pomocí softwaru Luthien jsme získali procentuální zastoupení jednotlivých konformací DNA. Konformace DNA mohou být stočené, kruhové (SSB) či lineární (DSB) dvoušroubovice (obr. 5). Z poměrů plochy jednotlivých píků jsme stanovili výtěžky jednoduchých a dvojných zlomů DNA. Výsledky uvádíme dále v tabulce a grafu.



Obr. 5 Zlomová poškození DNA

Ethanol					
Vzorek	Koncentrace	Stočená	Lineární	SSB	DSB
1	1M	90,16	0	0,103584	0
2	1M	85,31	0,79	0,166747	0,007963
3	0,1M	70,4	1,8	0,368817	0,01833
4	0,1M	81,59	2,63	0,229424	0,02701
5	0,01M	53,05	0,8	0,641903	0,008065
6	0,01M	57,3	1,77	0,574415	0,018019
7	0,001M	47,79	0,37	0,742047	0,003714
8	0,001M	44,7	0,49	0,810085	0,004924
9	0M	28,49	1,27	1,268237	0,012863
10	0M	34,88	0,57	1,05894	0,005733

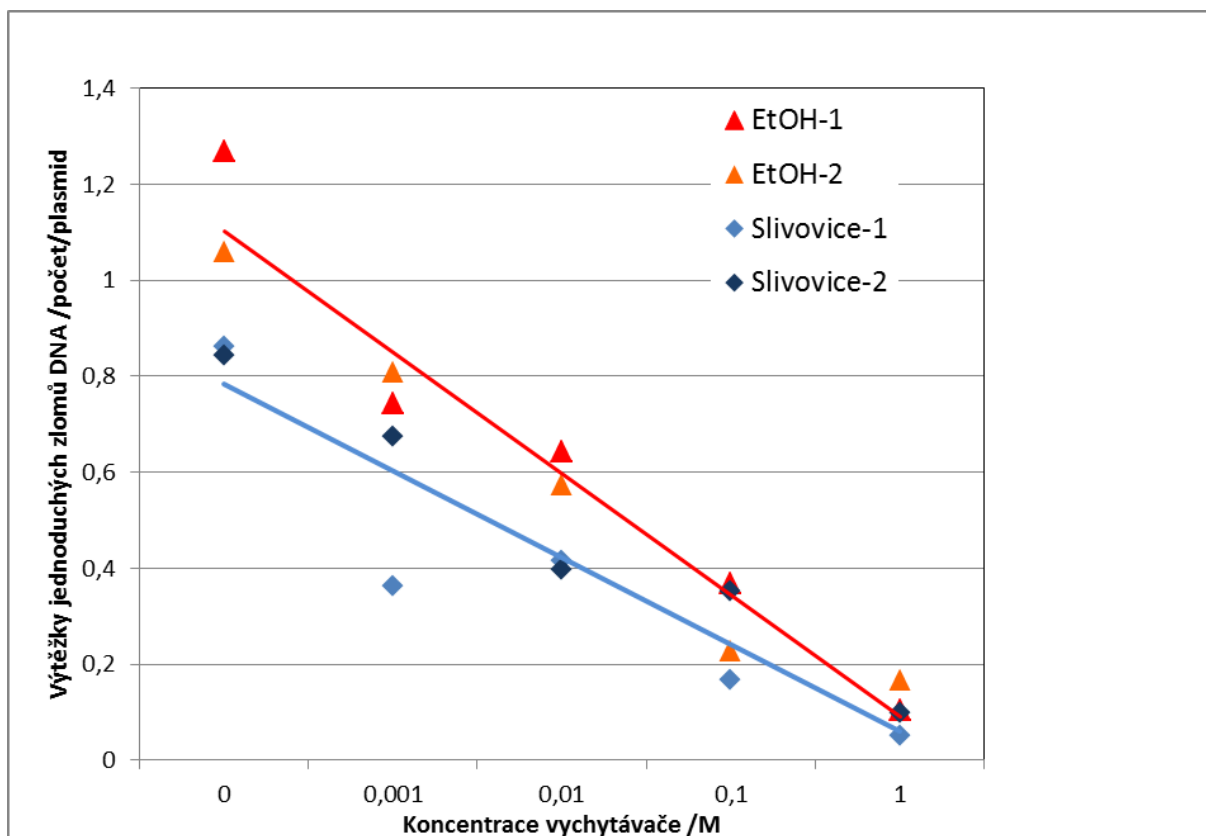
Slivovice					
Vzorek	Koncentrace	Stočená	Lineární	SSB	DSB
1	0M	43,09	1,9	0,861	0,019
2	0M	43,26	0,52	0,843	0,005
3	1M	90,51	0	0,100	0,000
4	1M	94,99	0	0,051	0,000
5	0,1M	74,98	6,56	0,351	0,070
6	0,1M	85,83	1,6	0,169	0,016
7	0,01M	68,17	1,31	0,396	0,013
8	0,01M	66,81	1,16	0,415	0,012
9	0,001M	51,78	1,51	0,673	0,015
10	0,001M	70,54	1,45	0,363	0,015

Tab. 3, 4 Procentuální zastoupení jednotlivých struktur DNA a odpovídající množství SSB a DSB

Legenda k tabulkám

SSB – single strand-break – jednoduchý zlom

DSB – double strand-break – dvojný zlom



Obr.6 Závislost množství jednoduchých zlomů na koncentraci vychytávače

3 Shrnutí

Na gelu po ozáření UV se vyobrazily tři píky (viz Obr. 3, 4). Dolní pík znázorňoval formu stočenou (nepoškozenou DNA), horní pík formu relaxovanou a střední formu lineární.

Dle našich předpokladů chrání ethanol i slivovice lidskou DNA před ionizačním zářením. V běžném životě není možné chránit DNA slivovicí ani jiným typem alkoholu, neboť by člověka dříve zabil alkohol než pronikající záření (alkohol by se měřil v procentech, nikoli v promile).

Poděkování

Naše poděkování patří především Ing. Marii Davidkové, CSc. a jejím kolegům za jejich cenné rady při řešení našeho výzkumného úkolu.

Reference:

[1] VON SONNTAG, C.: Free-radical-induced DNA damage and its repair, a chemical perspective, Springer, Heidelberg 2006.

[2] <http://breakingmuscle.com/health-medicine/how-to-strengthen-your-dna-and-create-super-babies> (20. 05. 2014)