

# Abstinent versus alkoholik: na koho si vsadit v případě jaderné katastrofy

Kristýna Pechová - Gymnázium Joachima Barranda Beroun  
kristynapechova2010@seznam.cz

Kristýna Vagnerová - Gymnázium a SOŠ Plasy  
vagnerova01@seznam.cz

Václav Špička - Gymnázium Varnsdorf  
abcvasa007@gmail.com

Tomáš Vendlberger – SPŠ Ostrov  
T. Vendlberger@seznam.cz

### **Abstrakt:**

Ionizující záření poškozuje biologické struktury živých organismů, zejména jejich DNA. Naším cílem bylo prozkoumat možnou ochranu DNA pomocí ethanolu. K tomu využijeme roztok plasmidové DNA reprezentující buňku. Po ozáření jsme použili elektroforézu pro analýzu poškození. Ethanol se ukázal jako účinný vychytávač.

## **Úvod**

Jaderná katastrofa je jednou z nejvíce obávaných událostí posledních sta let. Ionizujícímu záření však nejsme vystaveni jen v tomto případě, setkáváme se s ním při léčbě některých druhů nádorů, při rentgenovém vyšetření, vyskytuje se v radioaktivních izotopech prvků jako je uran, radon a mnoha dalších a také ve slunečním i kosmickém záření z vesmíru. Země je před tímto zářením chráněna díky stínění atmosféry a magnetickému poli. To však neplatí pro kosmonauty ve vesmíru, které ohrožuje na životě.

Ionizující záření poškozuje biologické struktury živých organismů, neboť vede k ionizaci molekul, tedy k odtržení elektronů z elektronového obalu atomů. Ionizaci můžeme rozdělit na přímou a nepřímou, přičemž účinky přímé ionizace vychází z přímé absorpce ionizační energie jádrem buňky. K nepřímé ionizaci vede uvolňování volných radikálů z vody, které též reagují s buněčnými strukturami<sup>1</sup>. Nepřímé záření je pravděpodobnější, a proto pro nás představuje větší hrozbu.

Nejzávažnější riziko, kterému organismus v tomto směru čelí, je narušení DNA a následná mutace. Při ionizaci hrozí poškození bází (adenin, guanin, cytosin, thymin) a jejich nesprávné propojení (cross-linky uvnitř DNA nebo mezi DNA a bílkoviny) a také zlom na vláknech DNA. V tomto případě pracujeme s plasmidem, stočenou částí DNA o velikosti 4361 bázových páru, která je v prokaryotických buňkách. U plasmidové DNA rozlišujeme jednoduchý a dvojný zlom. Jednoduchý zlom vede ke kruhové formě molekuly, dvojný zlom k linerární<sup>2</sup>.

Existují způsoby, jak ionizaci organismu zabránit (stínění, velká vzdálenost od zdroje záření, či vyčkání, dokud radiace neklesne). Další možností je užití scavengerů, neboli vychytávačů, které omezují volné radikály a jejich vznik (např. thioly, vitamin E, vitamin C, alkoholy).

V našem experimentu jsme využili plasmid a ethanol v rozličné koncentraci. Za využití elektroforetické metody prozkoumáme různé formy poškození DNA na základě jejich pohyblivosti v gelovém nosném médiu.

## **Postup**

Projekt byl realizován na Oddělení dozimetrie záření, Ústavu jaderné fyziky AVČR.

Pro ověření hypotézy, zda ethanol ovlivňuje riziko poškození DNA při vystavení ionizujícímu záření, jsme použili metodu agarózové elektroforézy. Principem této separační metody je pohyb záporně nabitých molekul DNA v elektrickém poli směrem k anodě, molekuly DNA se oddělují na základě rozdílných rychlostí, nepřímo úměrných jejich struktuře a velikosti<sup>3</sup>. Jako modelový vzorek DNA jsme použili plasmidovou DNA, která se nachází u bakterií (plasmid pBR322). Nejprve jsme si připravili agarózový gel pro elektroforézu, do nějž jsme přidali TAE pufr a fluorescenční barvivo SYBR Green I. Následně jsme se věnovali přípravě vzorků plasmidové DNA, ke kterému jsme přidali různá množství ethanolu o rozličných koncentracích (tab. 1), fosfátového pufru draselného a vody. Poté jsme vzorky plasmidů ozářili dávkou 50 Gy gamma

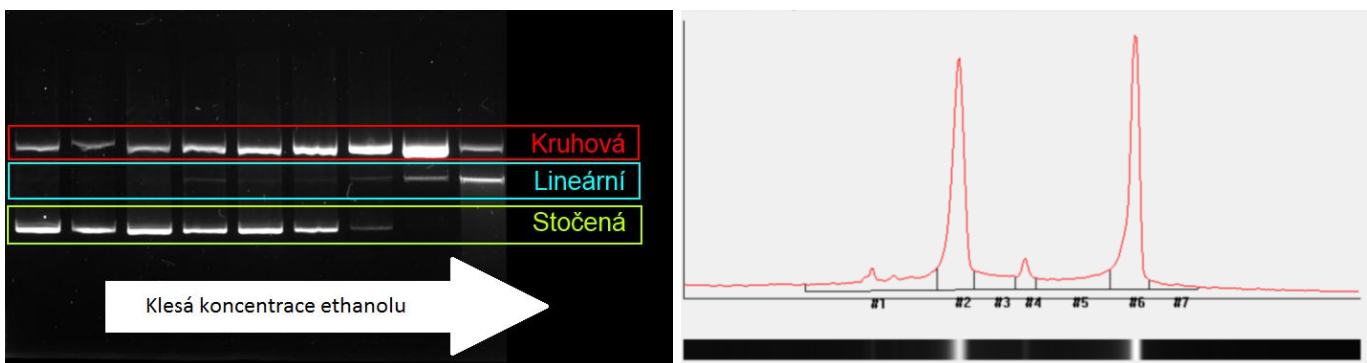
zdrojem  $^{60}\text{Co}$ . Po 11 minutách a 9 vteřinách ozařování jsme dali vzorky chladit a pokračovali s vytvořeným gelem. Do předem vytvořených jamek jsme nanесли stejná množství vzorků plasmidů a pokračovali elektroforézou, která trvala 60 minut, během kterých došlo k migraci jednotlivých forem plasmidů, do vzdálenosti, která odpovídá míře poškození plasmidové DNA. Výsledný stav gelu z elektroforézy jsme digitalizovali z obrázku vyfocené pomocí UV záření. Následně jsme výsledné hodnoty vyhodnotili v programu Luthien, kde jsme zintegrovali gel a vypočetli plochu píků spekter.

Tabulka 1 Koncentrace etanolu v jednotlivých vzorcích plasmidu

Vzorek plasmidu	Ethanol (objemová procenta)
1	25,000
2	10,000
3	2,500
4	1,000
5	0,250
6	0,100
7	0,025
8	0,010
9	0,000

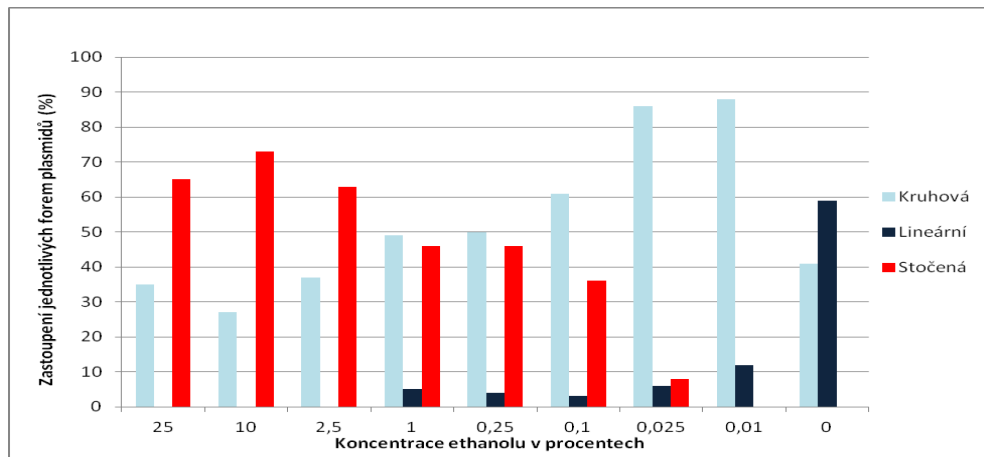
Na obrázku 1 vlevo gelu se zviditelněnými plasmidovými DNA pomocí fluorescenčního barviva můžeme vidět jednotlivé konformace, které vznikly následkem poškození ionizujícím zářením, každá odpovídá různému stupni poškození. Stočená DNA migrující nejvyšší rychlostí je nepoškozena, kruhová, nejpomalejší konformace vznikla následkem jednoho zlomu a lineární konformace je výsledkem dvojného zlomu. S klesající koncentrací ethanolu vymizí stočená forma plasmidu a naopak se objeví forma lineární.

Na obrázku 1 vpravo je příklad spektra vzorku s koncentrací 1 objemové % ethanolu. Pík 2 odpovídá kruhové formě, pík 4 odpovídá formě lineární a pík 6 formě stočené.



Obrázek 1 Gel s jednotlivými konformacemi plasmidu po ozáření v závislosti na koncentraci ethanolu (klesající ve směru šipky). Vpravo je ukázka spektra s 1 obj. % ethanolu.

Graf na obrázku 2 shrnuje zastoupení plasmidových konformací pro použité koncentrace ethanolu.



Obrázek 2 Zastoupení forem plasmidu v závislosti na koncentraci alkoholu

## Závěr

Dospěli jsme k závěru, že ethanol zvyšuje odolnost plasmidové DNA vůči ionizujícímu záření díky své schopnosti vychytávat produkty hydrolýzy vody a tím potlačovat nepřímý efekt záření. Tento závěr se však nedá obecně vztáhnout na člověka užívajícího alkohol, proto bychom si nevsadili v případě jaderné katastrofy na alkoholika.

## Poděkování

Rádi bychom vyjádřili vřelé díky Fakultě jaderné a fyzikálně inženýrské ČVUT za poskytnutí příležitosti, při které jsme se mohli podílet na tomto projektu a mnoha jiných zajímavých programech. Zároveň jsme vděční všem organizátorům této akce a pracovníkům Oddělení dozimetrie záření Ústavu jaderné fyziky AV ČR. Konkrétně Ing. Kateřině Pachnerové Brabcové Ph.D. za vedení a veškerou pomoc.

## Reference:

- [1] VON SONNTAG C.: Free-radical-induced DNA damage and its repair, a chemical perspective, Springer, Heidelberg 2006.
- [2] KUNA P. – NAVRÁTIL L.: Klinická radiobiologie, Manus, Praha 2005.
- [3] GARFIN D.E.: Electrophoretic methods, Academic Press, 2000.