

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

A. Zethnerová¹, P. Kozák², V. Klacko³

Arcibiskupské gymnázium Praha¹, Gymnázium Písek², Gymnázium Olgy Havlové Ostrava³

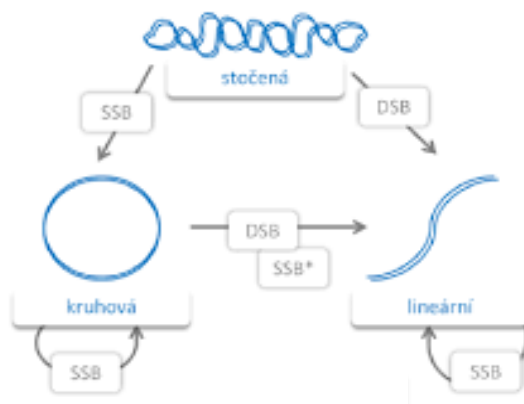
atenea.zethnerova@gmail.com¹, petrkozak123@seznam.cz²,
viktorklacko@icloud.com³

Abstrakt:

Práce se zabývá vlivem alkoholu na stupeň poškození plasmidové DNA ionizujícím zářením. Pomocí metody agarózové elektroforézy jsme zpracovali devět ozářených vzorků o různé koncentraci etanolu, které jsme následně vyhodnotili v programu Luthien. Po zpracování dat jsme dokázali, že alkohol do určité míry působí jako radioprotektivum.

1 Úvod

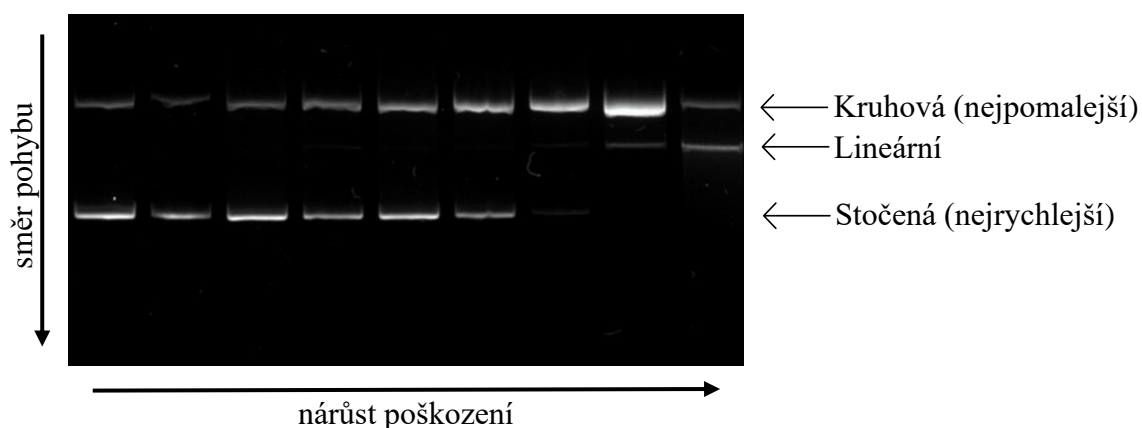
Molekula deoxyribonukleové kyseliny (DNA) je nosičem genetické informace živých organismů. Její vnitřní vazby i vazby s buněčnými bílkovinami definují její komplexní prostorové uspořádání. Poškození DNA, vystavením škodlivému gama záření může mít fatální následky pro celý lidský organismus, což často ústí i ve smrt. V některých specifických situacích nebo povoláních musíme člověka co nejlépe před radioaktivitou chránit, a to odstíněním, vzdáleností a snížením doby vystavení na minimum. Existují i látky, které nás do určité míry dokážou před radiací ochránit, mimo jiné k nim patří etanol.



Obrázek 1: Přehled různých konformací plasmidové DNA

V pokusu jsme požili plasmidovou DNA. Plazmid je malá část DNA vyskytující se volně v cytoplazmě bakterií. Působením ionizujícího záření můžou na DNA vznikat různá poškození. Na plasmidech podle typu a rozsahu poškození vznikají tři konformace – stočená nepoškozená forma bez zlomů, kruhová s jedním, nebo několika od sebe dostatečně vzdálenými jednoduchými zlomy a lineární s dvojným zlomem. Tyto konformace jsou vyobrazené na obrázku 1.

K zjištění účinnosti etanolu jakožto radioprotektiva DNA lze použít agarózovou elektroforézu. Principem agarózové elektroforézy je migrace záporně nabitě buněčné DNA ke kladnému pólu anody, kdy se molekuly DNA oddělují v závislosti na rozdílných konformacích plasmidu. Rozdílná pohyblivost těchto forem v agarózovém elektroforetickém systému zajišťuje vizuální demonstraci poškození jednotlivých vzorků, DNA je zviditelněna fluorescenčním barvivem. Na obrázku 2 je znázorněno rozdělení různých konformací plasmidové DNA pod vlivem elektrického pole.



Obrázek 2: Rozdělení konformací plasmidové DNA vlivem elektrického pole.

2 Praktická část

Materiály a metody

Nejdříve jsme si připravili 1 % agarózový gel. K přípravě gelu jsme navázili 0,4 g agarózy SERVA a přidali 40 ml TAE pufru. Gel jsme uvařili, přidali SYBR Green I v poměru 1:10000 a nechali chladnout za pokojové teploty.

Následovala příprava vzorků DNA z odsoleného plasmidu Pbr322 s 4361 bázovými páry. Do každého vzorku s celkovým objemem 12 μ l jsme dali 100 ng DNA a jiné množství etanolu. Množství použitého etanolu je uvedeno v tabulce 1.

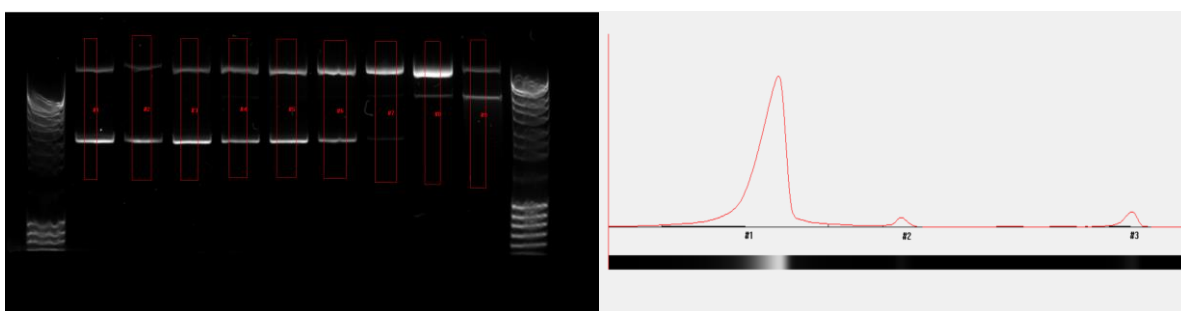
Vzorek plasmidu	Etanol (objemová %)
1	25,000
2	10,000
3	2,500
4	1,000
5	0,250
6	0,100
7	0,025
8	0,010
9	0,000

Tabulka 1: Objemové procentuální zastoupení etanolu ve vzorcích

Následovalo ozáření vzorků gama zářičem ^{60}Co dávkou 50 Gy. Pro doručení této dávky bylo potřeba mít vyjetý od stínění ozařovač po dobu 18 minut a 52 sekund. Doba ozařování radionuklidem se stále prodlužuje, jelikož se radioaktivní izotop rozpadá a má tak menší aktivitu.

Po ozáření jsme do každého vzorků přidali 2 μl loading pufru. Do připravené horizontální lázně vyplněné 0,5x TAE puftrem jsme přesunuli vychladlý gel. Do gelu jsme nanесли pomocí pipet vzorky a poté připojili na hodinu na zdroj o napětí 100 V a nechali DNA migrovat v elektrickém poli.

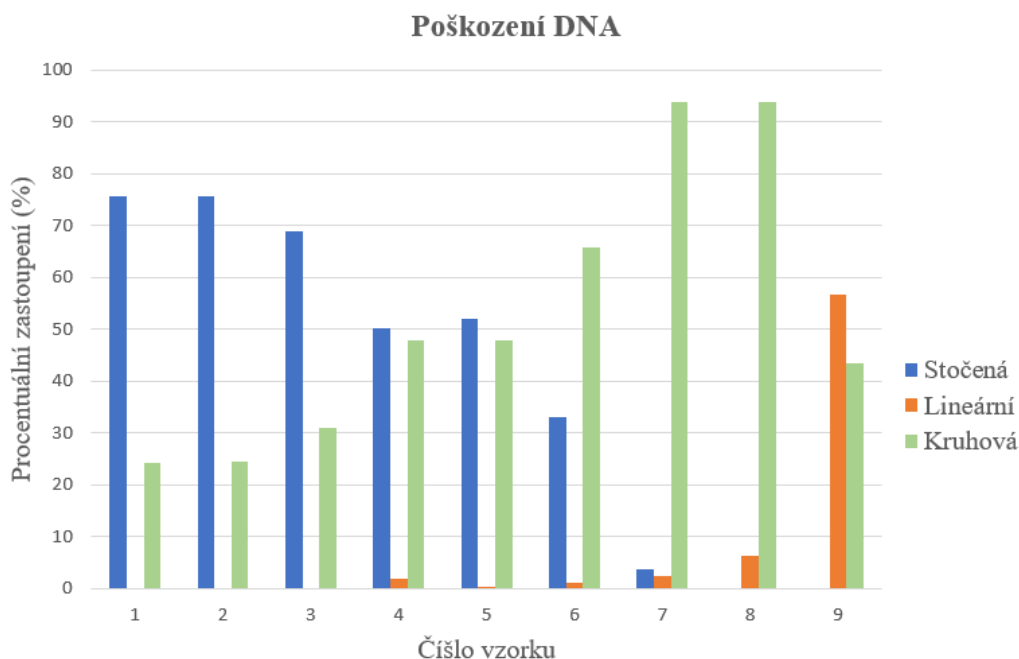
Po ukončení migrace se gel vyfotil na UV stolku a zastoupení jednotlivých konformací plasmidu v každém vzorku bylo vyhodnoceno programem Luthien. Na obrázku 3 je znázorněn postup vyhodnocení gelu. Nejprve se vyberou na gelu oblasti jednotlivých vzorků a tím vzniknou grafy, kde píky znázorňují jednotlivé konformace plasmidu. Píky se zintegrují a tím se dostane procentuální zastoupení jednotlivých konformací pro každý vzorek.



Obrázek 3: Zpracování gelu programem Luthien

Výsledky

Procentuální zastoupení jednotlivých forem plasmidu pro každý vzorek jsme si vyexportovali do MS Excelu a připravili graf na obrázku 4, kde je patrné, že se snižující se koncentraci etanolu ve vzorku dochází k vyššímu poškození plasmidové DNA.



Obrázek 4: Procentuální zastoupení různých konformací plasmidu pro ozářené vzorky s různým obsahem etanolu.

Diskuse

Provedli jsme experiment pro zjištění, zda má alkohol radioprotektivní účinky. Zjistili jsme a potvrdili hypotézu, že alkohol při vyšší koncentraci zabraňuje rozsáhlejšímu poškození DNA. Etanol vylučuje volné radikály a potlačuje nepřímý efekt záření. Za normálních podmínek nám však alkohol v krvi proti záření moc nepomůže, koncentrace alkoholu, která je schopna zablokovat kompletně záření je tak vysoká, že by člověk daleko dříve zemřel na otravu alkoholem nežli na následky ionizujícího záření. Experiment tak byl spíše záležitostí pro zajímavost než pro reálné využití.

3 Závěr

Na modelovém systému plasmidové DNA jsme prokázali, že alkohol funguje jako radioprotektivum. Kdyby množství alkoholu potřebné k dosažení tohoto účinku nebylo letální, tak bychom si vsadili na alkoholika. Bohužel však realita je jiná. V případě jaderné katastrofy, by alkoholikovi alkohol pomohl pouze v tom, že by umíral veselý.

Poděkování

Poděkování za konzultaci, provedení projektem a ochotu patří naší supervizorce Ing. Anně Jelínek Michaelidesové Ph.D. Velké díky patří také všem organizátorům Týdne vědy na Jaderce.

Reference

- [1] Plazmid. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2021 [cit. 2022-06-21]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Plazmid>
- [2] Sborník TV@J 2018. Týden vědy na Jaderce [online]. Praha, 2018 [cit. 2022-06-21]. Dostupné z: <https://tydenvedy.fjfi.cvut.cz/2018/output/sbornik/proceeds.pdf>
- [3] Materiály k úloze od Ing. Kateřiny Pachnerové Brabcové Ph.D., ODZ ÚJF AV ČR