



© Е. П. Гуськов, Е. В. Машкина,
Н. И. Беличенко, Т. В. Вардуни,
Г. И. Волосовцова,
И. О. Покудина, Г. Е. Гуськов,
Т. П. Шкурат

НИИ биологии при ЮФУ,
г. Ростов-на-Дону

✿ Статья посвящена проблеме преадаптации метаболических систем организма в результате воздействия окислительного стресса, индуцируемого гипербарической оксигенацией (0,2 МПа), на новорожденных крыс, а также оценке степени и длительности сохранения метаболического следа после этого воздействия. Рассмотрены возможности повышения устойчивости животных к воздействию стрессорных режимов окислительного стресса, индуцируемого гипербарической оксигенацией (0,5 МПа) после их преадаптации в новорожденный период. Исследованы мутационные процессы в отдаленные сроки после преадаптации, оценены изменения нормы реакции на окислительный стресс в потомстве, полученном от реципрокных скрещиваний преадаптированных крыс.

✿ **Ключевые слова:** преадаптация; адаптация; окислительный стресс; абберации хромосом; SOS-lux тест; стрессорные воздействия; материнское наследование; гипербарическая оксигенация 0,2 МПа.

МУТАЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ У ЖИВОТНЫХ, ПРЕАДАПТИРОВАННЫХ К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ

ВВЕДЕНИЕ

Проблема повышения устойчивости организма к воздействию экстремальных факторов среды является весьма существенной и актуальной. В качестве одного из способов повышения устойчивости организма к воздействию экстремальных факторов была предложена его предварительная обработка малыми дозами токсического агента, которая получила название предварительной адаптации или преадаптации (ПА). Согласно концепции, сформулированной Ригером и Михаэлисом (1978), предобработка организма малыми дозами мутагенов или стрессорных агентов повышает устойчивость клеток к последующим мутагенным воздействиям. Феномен повышения устойчивости организма в результате преадаптации получил название адаптивного ответа (Samson, 1977). Показана неспецифичность феномена адаптивного ответа для различных факторов, условий воздействия (*in vivo* и *in vitro*) и объектов (микроорганизмы, растения и животные) (Опритов и др., 1993; Luk'ianova L. D., 2003; Fekete et al., 2007).

На клеточном уровне сигналом для запуска неспецифической адаптационной реакции служит сдвиг прооксидантно — антиоксидантного равновесия в направлении активации процессов перекисного окисления липидов в биологических мембранах и жидкостях — т. е. окислительный стресс (Ames, 1981, 1992; Барабой, 2002). Окислительный стресс является индуктором запуска неспецифических реакций, в результате которых реализуется каскад разнонаправленных метаболических процессов, результатом которых может быть деструкция мембран, инактивация активности ферментов и гормонов, повреждения ДНК, нарушение клеточного цикла и, в конечном итоге, гибель клетки (Меерсон, 1981; Гуськов, Шкурат, 1985; Chiu et al., 1989, 1997; Jackson et al., 1998; Bunout, Cambiazo, 1999; Kang et al., 1999; Klein et al., 2003; Singh, 2004; Saada H. N. et al., 2008; Sasazuki S. et al., 2008).

Ранее было показано, что предварительное воздействие малых доз ГБО может повышать устойчивость организма к более сильным воздействиям в результате преадаптации метаболических систем организма, приобретенной в процессе реакции на первичное воздействие (Гаркави, Квакина, 1990). В то же время, онтогенетический аспект этого явления ранее практически не был освещен в научной литературе. Немногочисленные исследования, посвященные этой проблеме и выполненные на низших позвоночных (Тимофеева, 1997), оказались недостаточными для анализа механизма установления устойчивости ювенильных форм, обработанных низкими дозами агентов, к экстремальным воздействиям, которым подвергается организм во взрослом состоянии. Однократное воздействие гипербарической оксигенации на ранних этапах онтогенеза *Xenopus laevis* изменяет способность антиоксидантных систем взрослого организма реагировать на окислительный стресс, причем малые давления (0,2 МПа) способствуют биохимической адаптации, в то время как высокие (0,7 МПа) приводят к дисбалансу и ингибированию систем, ответственных за антиоксидантную защиту. Эти данные свидетельствуют о формировании онтогенетического импринтинга после адаптивного воздействия окислительного стресса (Гуськов, Тимофеева, Милютин и др., 1999).

Поступила в редакцию 09.02.2009
Принята к публикации 19.03.2009



Рис. 1. Схема постановки эксперимента

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценить степень и длительность сохранения метаболического следа после воздействия на новорожденных крыс низкой дозы окислительного стресса, индуцируемого ГБО (0,2 МПа), оценить возможность повышения устойчивости преадаптированных животных к воздействию стрессорных режимов агента (0,5 МПа) в отдаленные сроки после преадаптации, а также оценить изменение уровня аберраций хромосом в ответ на окислительный стресс, индуцируемый ГБО (0,5 МПа) в потомстве, полученном от реципрокных скрещиваний преадаптированных (0,2 МПа) в новорожденный период крыс.

МЕТОДИКА

Эксперимент проводили на белых беспородных крысах (самцах и самках), которые содержались в условиях вивария и были разделены на группы по 10 особей в каждой (по 5 самцов и самок). Животных подвергали действию кислорода под давлением в специальных барокамерах объемом 25 л с щелочным поглотителем углекислоты. Компрессию и декомпрессию проводили со скоростью 0,1 МПа в минуту. В качестве «малой дозы» окислительного стресса был выбран режим ГБО 0,2 МПа-1ч., поскольку в предыдущих исследованиях, выполненных на базе НИИ биологии РГУ, был показан преадаптирующий эффект именно этого режима (Брень, 1997; Тимофеева, 1997; Гуськов, Тимофеева, Милютин и др., 1999). В качестве стрессорного воздействия был использован режим ГБО 0,5 МПа в течение 1 часа, который не вызывает гибели животных, что позволяет изучать изменение основных показателей адаптации крыс к окислительному стрессу в динамике.

СХЕМА ПОСТАНОВКИ ЭКСПЕРИМЕНТА

Группа I — Интактные крысы (К).

Группа II — Животные, обработанные сразу после рождения ГБО 0,2 МПа-1ч.

Группа III — Животные, обработанные в возрасте 6 месяцев ГБО 0,5 МПа-1ч.

Группа IV — Животные, преадаптированные в новорожденный период (0,2 МПа-1ч) и обработанные через 6 месяцев ГБО 0,5 МПа-1ч.

Животные данных четырех групп были декапитированы в возрасте 6 месяцев.

Наследование адаптивных свойств к окислительному стрессу изучали на потомках, полученных в результате реципрокных скрещиваний животных, которые были обработаны в новорожденном периоде повышенным давлением кислорода 0,2 МПа-1ч.:

$\text{♀К} \times \text{♂К}$ — ♀ интактный контроль \times ♂ интактный контроль

$\text{♀ПА} \times \text{♂К}$ — ♀ 0,2 МПа-1ч. \times ♂ интактный контроль

$\text{♀К} \times \text{♂ПА}$ — ♀ интактный контроль \times ♂ 0,2 МПа-1ч

Потомство, полученное в результате данных скрещиваний, в половозрелом возрасте подвергали воздействию ГБО в режиме 0,5 МПа-1час.

Эксперимент был проведен в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г.). В вариантах опыта, где воздействие ГБО проводили в режиме 0,5 МПа-1 ч., животных декапитировали сразу (0 ч) и через сутки (24 ч) после окончания действия кислорода.

Для цитогенетических исследований готовили временные давленные препараты роговицы глаз по стандартной методике (Дарлингтон, 1980). В препаратах роговицы про-

Таблица 1

Интенсивность биолюминесценции (усл. ед.) клеток *E. coli* ПТ-1 в присутствии гомогенатов тканей после пребывания крыс в условиях ГБО 0,5 МПа

Вариант	Группа I	Группа II	Группа III — 0 ч.	Группа III — 24 ч.	Группа IV — 0 ч.	Группа IV — 24 ч.
Мозг	1,02 ± 0,05	1,14 ± 0,12	0,72 ± 0,04 ***	0,91 ± 0,09	1,42 ± 0,15 *	1,19 ± 0,15
Печень	0,96 ± 0,03	1,27 ± 0,13 *	1,3 ± 0,05 ***	2,0 ± 0,14 ***	1,15 ± 0,09	1,01 ± 0,07
Легкие	0,92 ± 0,04	1,36 ± 0,19 *	1,27 ± 0,03 ***	1,78 ± 0,04 ***	1,54 ± 0,15 ***	1,21 ± 0,17

Примечание * — достоверность отличия от интактного контроля (группа I) при $p < 0,05$;
*** — достоверность отличия от интактного контроля (группа I) при $p < 0,001$

водили анафазный анализ, в ходе которого учитывали хромосомные фрагменты, хроматидные фрагменты, хромосомные и хроматидные мосты, а также осуществляли подсчет митотического индекса. В каждом варианте анализировали не менее 1500 анафаз.

Уровень накопления генотоксичных продуктов в мозге, легких и печени животных, подвергшихся действию гипероксии, определяли методом биолюминесцентного анализа SOS-ответа клеток *E. coli* С 600. Использовали штамм *E. coli*, несущий рекомбинантную плазмиду pPLS — 1, которая является производной lux-оперона морской фотобактерии (*Photobacterium leiognathi*), лишенной собственного промотора (Птицын, 1996). Тестируемые гомогенаты тканей животных инкубировали с аликвотами культуры *E. coli* в течение 1,5 ч. В присутствии веществ или агентов, повреждающих ДНК, биолюминесцентная система клеток *E. coli* дает оптический сигнал, который регистрировали на хемилуцинометре. Степень индукции люциферазы (Ic) определяли как отношение интенсивности свечения культуры *E. coli*, содержащей гомогенаты тканей, к интенсивности свечения «чистой» культуры *E. coli*.

Достоверность полученных различий оценивали согласно t — критерия Стьюдента для средних арифметических из независимых выборок (Лакин, 1990).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основной причиной нарушения целостности ДНК при различных стрессорных воздействиях является прямое и опосредованное действие активных метаболитов кислорода. Известно, что повышение интенсивности свободно-радикальных процессов влияет на регуляцию пролиферации и индукцию SOS-ответа клетки, приводит к окислительной модификации биомолекул и повреждению биомембран, нарушению структурно-метаболического гомеостаза и повышению уровня аберраций хромосом (Владимиров, 1993, 1994; Владимиров и др., 1991; Зенков и др., 2001).

Поэтому степень мутагенного и кластогенного действия какого-либо фактора может служить критерием уровня, направленности и выраженности протекающих в организме процессов свободно-радикального окисления.

С помощью SOS-lux теста было изучено влияние пребывания животных в условиях ГБО 0,5 МПа-1 ч на на-

копление в мозге, легких и печени генотоксичных метаболитов.

Как видно из таблицы 1, ткани интактных животных (группа I) не влияют на фоновый уровень хемилуминесценции клеток *E. coli*. Сразу и через 24 часа после обработки неприспособленных животных ГБО (группа III) в легких и печени было зарегистрировано накопление метаболитов, индуцирующих SOS-сигнал в клетках *E. coli*, уровень которых достоверно отличается от их уровня у интактных животных. Более того, через 24 часа после окончания воздействия ГБО (группа III 24 часа) уровень биолюминесценции гомогенатов печени и легких животных данной группы в 2 раза превышает таковой показатель для группы I.

В группе преадаптированных животных (IV), если сразу после воздействия ГБО регистрировали достоверное увеличение уровня генотоксичных метаболитов во всех исследуемых тканях, то через сутки после воздействия ГБО величина фактора индукции (Ic) SOS-репарации клеток *E. coli*, индуцируемого гомогенатами всех исследованных нами тканей, не только не повышалась, а была в пределах контрольных значений. Можно предположить, что первичная стрессорная реакция на внешнее экстремальное воздействие у животных данной группы не приводит к существенному изменению метаболизма клеток, а эффективность функционирования защитных систем, в том числе и антиоксидантных, высока.

Таким образом, если после пребывания неприспособленных животных в условиях ГБО в исследованных тканях обнаруживаются метаболиты, оказывающие влияние на формирование ДНК-репарационного SOS-ответа клеток у *E. coli*, то после воздействия низкой дозы ГБО на новорожденных животных действие стрессорного режима на взрослых животных не изменяет величину фактора индукции SOS-репарации.

Анализ аберраций хромосом показал, что после действия токсической дозы ГБО (0,5 МПа) (группа III), регистрируется повышенный уровень аберраций хромосом в эпителиоцитах роговицы животных, который сразу после окончания воздействия ГБО более чем в 2 раза превышает уровень перестроек хромосом у интактных животных (группа I) (табл. 2). Однако через 24 часа уровень аберраций хромосом соответствует контрольному показателю.

Преадаптация новорожденных крыс низкой дозой ГБО (0,2 МПа-1ч.) приводит к существенному снижению уровня

Таблица 2

Частота aberrаций хромосом в эпителиоцитах роговицы глаза крыс, подвергшихся действию гипербарической оксигенации

Группа	Всего анафаз	=	—	— — —	X	Z	—X—	% AXp ± m
I	1206	3	16	5	3	1	0	2,32 ± 0,43
II	4806	2	22	3	6	3	0	0,75 ± 0,12 ***
III-0ч.	3246	10	82	37	11	6	5	4,7 ± 0,37 ***
III-24ч.	5636	9	80	24	18	16	8	2,8 ± 0,22
IV-0ч.	4501	2	19	5	2	9	0	0,82 ± 0,13 ***
IV-24ч.	3377	1	22	3	1	3	0	0,89 ± 0,16 ***

Примечание: *** — достоверность отличия от интактного контроля при $p < 0,001$.

(Условные обозначения: = хромосомный фрагмент, — хроматидный фрагмент, — — — множественные фрагменты, X — хромосомный мост, Z — хроматидный мост, —X— — наличие в клетке моста с фрагментами)

Таблица 3

Уровень aberrаций хромосом (%) в эпителиоцитах роговицы глаз потомков, полученных от реципрокных скрещиваний преадаптированных крыс и подвергшихся действию гипербарической оксигенации —0,5 МПа-1ч

Вариант		Контроль	ГБО — 0 ч	ГБО — 24 ч
Контроль		1,7 ± 0,18	6,7 ± 0,41 ***	5,4 ± 0,29 ***
F1	♀ ПА × ♂ К	2,5 ± 0,27 **	2,3 ± 0,27	2,4 ± 0,34
F1	♀ К × ♂ ПА	2,6 ± 0,47	1,9 ± 0,17	4,3 ± 0,27 ***

Примечание: ** — достоверность отличия от собственного контроля при $p < 0,01$;

*** — достоверность отличия от собственного контроля при $p < 0,001$

aberrаций хромосом (II), который не изменяется после повторного воздействия ГБО в половозрелом возрасте (группа IV) сразу и через сутки после воздействия 0,5 МПа-1ч. То есть, кластогенная адаптация к повторному воздействию ГБО сохраняется в течение длительного времени.

Таким образом, на основе использования одного из основных критериев адаптивного ответа — уменьшения уровня aberrаций хромосом после воздействия токсической дозы агента, если ему предшествует воздействие низких доз, получены данные о возможности повышения устойчивости животных к окислительному стрессу. Одной из причин адаптации может быть повышение емкости антиоксидантных систем и активация первичных катаболических процессов сразу после воздействия ГБО, которая расширяет норму реакции клеток и повышает адаптивные возможности организма (Гуськов, Лукаш, 1987).

Во всех вариантах эксперимента у животных, полученных от реципрокных скрещиваний, уровень aberrаций хромосом находился в пределах спонтанного (1,7–2,6%) (табл. 3). Сразу после действия ГБО 0,5 МПа-1ч у потомков контрольных животных уровень AXp вырос в четыре раза, и через сутки он по-прежнему оставался на высоком уровне. У потомков, полученных от скрещивания преадаптированной матери и интактного отца (♀ ПА × ♂ К), после воздействия ГБО уровень aberrаций хромосом не изменяется и не отличается от «интактного» контроля. У животных, полученных от скрещивания интактной матери и преадаптированного отца (♀ К × ♂ ПА), сразу после действия повышенного давления кислорода не было зарегистрирова-

но изменений уровня AXp по отношению к собственному и интактному контролю. Через сутки уровень хромосомных aberrаций возрастал в 1,7 раза ($p < 0,001$).

Таким образом, показана возможность передачи устойчивости к стрессу от животных, однократно обработанных на ранней стадии онтогенеза низким режимом ГБО, своим потомкам. При этом более отчетливо это прослеживается в случае, когда преадаптированной была самка (материнский эффект). В нашем эксперименте окислительный стресс в исследуемых режимах ГБО вызывал существенное повышение выхода AXp в эпителиоцитах роговицы животных. В эпителиоцитах роговицы животных преадаптированных к окислительному стрессу после повторного воздействия (токсической дозы) агента, уровень AXp оставался в пределах адаптивной нормы.

Ранее было показано, что цитогенетические эффекты имеют порог чувствительности соматических тканей животных к гипербарической оксигенации. Так, не обнаружено повышения уровня aberrаций хромосом у животных, подвергшихся действию ГБО в режиме 0,12–0,15 МПа. Значимый цитогенетический эффект наблюдали при действии давления не менее 0,2 МПа (Гуськов, Шкурят, Беличенко и др., 2000).

Показано, что свободно-радикальные формы кислорода индуцируют однонитевые разрывы ДНК и модифицируют основания непосредственно в момент проникновения в ядро (Denng et al., 1996). Однако, уже в течение первого часа после окончания воздействия кислорода более 50% первичных повреждений ДНК репарируется. Через 24 часа

не обнаруживается 8-оксигуанина — продукта взаимодействия синглетного кислорода с ДНК (Speit et al., 1998).

С другой стороны, атака ДНК-ядер свободными радикалами, формирующимися в цитоплазме, может быть малоэффективна из-за защищенности хромосом ядерной мембраной. Митотические хромосомы являются более доступными для атаки вторичными метаболитами по сравнению с интерфазными, прежде всего, из-за отсутствия ядерной мембраны. По мнению ряда исследователей, система мембран возникла в процессе эволюции для защиты генетического материала от токсического действия кислорода, появившегося в результате фотосинтетической деятельности сине-зеленых водорослей (Sagan, 1967; Руттен, 1973). Кроме того, было показано, что ядерная мембрана в отличие от мембран других органелл более устойчива к перекислению из-за особенностей фосфолипидного состава. Очевидно, что возможность непосредственного контакта хроматина с железосодержащими цитоплазматическими белками, а также продуктами ПОЛ плазматической и цитоплазматических мембран, возникает только при отсутствии кариолеммы (в митотических клетках). Также показано, что основными индукторами цитогенетического эффекта может служить малоновый диальдегид, формируемый липидным слоем ядерной мембраны и образованием в ней разрывов и дополнительных пор, через которые проникают органические компоненты, обладающие кластогенной активностью (Гуськов, Шкурат, Беличенко и др., 2000).

Таким образом, при использовании одного из основных критериев развития адаптивного ответа — уменьшения уровня аберраций хромосом в ответ на действие токсического агента, наши исследования показали с одной стороны достоверное кластогенное действие ГБО (0,5 МПа) на интактных крыс и с другой стороны — отсутствие этого действия ГБО (0,5 МПа) у ранее преобработанных крыс малой дозой ГБО (0,2 МПа).

Устойчивость к окислительному стрессу после вторичного воздействия ГБО была показана ранее (Гуськов, Шкурат, 1985; Брень, 1997). При исследовании терапевтических эффектов ГБО методом клеточного электрофореза (методом комет) было установлено, что однократная обработка пациентов ГБО в режиме — 0,25 МПа — 20 минут вызывала значительные повреждения ДНК через 1 час после окончания сеанса. Обработка этих же пациентов ГБО в последующие сутки не вызывала повреждений ДНК. Подобные результаты получены на изолированных лимфоцитах, которые *in vitro* были обработаны перекисью водорода, полученных от тех же доноров, прошедших 1 сеанс ГБО. Этот защитный (адаптивный) результат наблюдали в течение недели как для клеток *in vitro*, так и *in vivo*. Полученные результаты позволили сделать вывод, что адаптивный ответ к окислительному стрессу реализуется на клеточном уровне (Rothfluss, Dennog, Speit, 1998). Однако в этих работах интервалы между воздействиями составляли от нескольких часов до нескольких суток.

Каковы же возможные механизмы передачи устойчивости к окислительному стрессу последующим поколениям?

Клетки и ткани на ранних стадиях индивидуального развития организма восприимчивы к внешним воздействиям и способны не только изменять собственные характеристики, но и передавать их следующему поколению клеток. Передача признака, приобретенного в результате первичного однократного воздействия, в ряду клеточных поколений была впервые описана Нанни (Nunney, 1958). У *Paramecium Aurelia* серотологическими методами обнаружено несколько поверхностных антигенов, наследуемых в ряду агамных поколений, однако после температурного шока происходит трансформация, в результате которой меняются специфические свойства антигенов, которые также наследуются в течение нескольких делений до тех пор, пока не произойдет конъюгация. Годом позже Эфрусси описал «эпигенетическую изменчивость» у многоклеточных организмов и показал, что константное вегетативное наследование приобретенных признаков связано не с изменением генотипа, а с изменением детерминант цитоплазмы. Ю. М. Оленов (Оленов, 1965) предложил для обозначения этого явления термин «эпигеномная изменчивость». В 2009 году показано, что эпигенетически могут наследоваться особенности работы мозга и нервных клеток, особенности памяти (Arai et al., 2009).

Эпигеномные изменения могут реализовываться на разных уровнях развития как результат изменения регуляции функций генов. Так, например, активность генов изменяется после метилирования ДНК, в результате которого проявляется геномный импринтинг (Surani, 1993), а также в результате модуляции синтеза специфических типов белков или модификаций трансляционных механизмов. Подобный эффект может быть получен в связи с изменением регуляторов фолдинга белков или их топографического распределения.

Причиной эпигеномных состояний могут стать изменения количественных и качественных характеристик ДНК митохондрий, которые обычно возникают после воздействия на клетку стрессующих агентов и т. д.

В наших исследованиях обнаружено наследование кластогенной адаптации к окислительному стрессу по материнской линии. При использовании основного критерия адаптивного ответа — уровня аберраций хромосом была показана возможность передачи устойчивости к стрессу от животных, однократно обработанных на ранней стадии онтогенеза низким режимом ГБО, своим потомкам. При этом более отчетливо это прослеживается в случае, когда преадаптированной была самка (материнский эффект).

Мы предполагаем, что повышенная устойчивость может формироваться благодаря генетически детерминированному повышению устойчивости митохондрий, которые наследуются, как правило, по материнской линии. Возможно, именно поэтому у потомков преадаптированных самцов уровень аберраций хромосом через 24 часа после окончания воздействия ГБО достоверно превышает как собственный контроль, так и интактный контроль (табл. 3).

Ранее было показано, что при проведении на протяжении 21 месяца пошаговой селекции культуры клеток HeLa к повышенному содержанию в дыхательной смеси кислорода, могут быть отобраны клетки, способные расти в атмосфере — 80 % O_2 , являющейся летальной для нормальных клеток HeLa. По сравнению с нормальными клетками, в клетках, адаптированных к гипероксии, количество митохондрий было меньше. Они имели менее плотный матрикс и были в три раза больше на срезе и в два раза больше по объему, хотя размеры нормальных и адаптированных клеток были одинаковы. Это позволило авторам предположить, что устойчивость адаптированных к кислороду клеток не обеспечивается за счет более низкого производства этими клетками АФК в условиях гипероксии. Уровень основных ферментов антиоксидантной защиты (СОД, каталазы и глутатионпероксидазы) был сходным у клеток обоих типов. Очевидно эти ферменты не играют значительной роли в повышении толерантности клеток HeLa к O_2 . Специфическая активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы — ключевого фермента для производства клеткой NADPH — также не была связана со степенью устойчивости к кислороду (Joenje et al., 1985). Это позволяет предполагать, что повышение устойчивости адаптированных клеток к кислороду базируется либо на способности этих клеток контролировать генерацию или удаление внутриклеточных АФК, либо на способности этих клеток восстанавливать или замещать поврежденные клеточные компоненты.

Для новорожденных животных была показана роль митохондрий в повышенной устойчивости к окислительному стрессу по сравнению с более взрослыми животными. Так, при изучении инактивации митохондриальной аконитазы и 8-OHdG как индикаторов уровня митохондриального супероксида и окислительных повреждений ДНК, соответственно, было выявлено, что у взрослых животных (30 постнатальный день и более) уровень инактивации митохондриальной аконитазы и содержание 8-OHdG увеличивались, чего не было зарегистрировано для незрелых крыс (12 и 21 постнатальные дни). При этом уровень MnSOD и CuZnSOD не изменялся ни у взрослых, ни у незрелых организмов. Эти результаты позволили предположить, что митохондриальный окислительный стресс может быть ключевым фактором, который обеспечивает устойчивость развивающегося организма к АФК-индуцированному повреждению (M. Patel et al., 2003).

На новорожденных кроликах показано, что почечная эмбриональная ткань практически не повреждается и сохраняет свою структуру при воздействии кислорода под различным парциальным давлением. При этом в тканях почки изменяется экспрессия гена *cox-2* (Strehl, Schumacher, Minuth, 2004).

Известно, что в митохондриях находится примерно 90 % клеточного кислорода, из них 2 % конвертируется в супероксидные радикалы. В условиях гипероксии нарушение функционирования электронтранспортной цепи митохондрий может приводить к повышению уровня свободных

радикалов. Металлосодержащие белки дыхательной цепи митохондрий — один из основных источников эндогенных активных форм кислорода в клетке (Melovs, Schneider, Day et al., 1998). В связи с этим мы проанализировали митохондриальный геном крысы, используя базы данных NCBI Mitochondria и Rat Genome Database.

На ДНК митохондрий крысы локализованы гены, кодирующие следующие белки:

цитохромоксидазы — COX1, COX2, COX3;
НАДФН дегидрогеназы — ND1–ND6, ND4L;
и цитохром В — *cytb*.

Частота спонтанных митохондриальных мутаций в 5–10 раз выше, по сравнению с ядерными (Brown et al., 1982), и при этом в условиях окислительного стресса наиболее часто регистрируются трансверсии. Более того, показана способность повреждений в митохондриальной ДНК персистировать, т. е. сохраняться в ряду клеточных поколений, в то время как повреждения ядерного генома эффективно репарируются. Вероятность возникновения новых изоформ белковых молекул после действия ГБО достаточно велика. Особое значение при этом будут иметь те белки, которые участвуют в контроле уровня АФК.

Возможно, в наших экспериментах материнский эффект устойчивости к окислительному стрессу может быть обусловлен появлением новых изоформ митохондриальных цитохромоксидаз.

Таким образом, на основании результатов проведенных исследований и данных литературы, мы предполагаем следующие возможные механизмы наследуемой адаптации новорожденных животных к окислительному стрессу:

- Геномный импринтинг материнских хромосом как следствие метилирования ДНК после окислительного стресса.
- Изменения сайтов локализации МГЭ может приводить к генетической экспрессии адаптивных признаков.
- Неспецифическая активация генов, контролирующих ROS-модулирующие ферменты в ядрах ооцитов.
- Формирование новых изоформ митохондриальных цитохромоксидаз.
- Селекция митохондрий в гетероплазматических клетках овариальных животных.

Литература

1. Барабой В. А., 2002. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов // Успехи современной биологии. Т. 3. С. 923–931.
2. Брень А. Б., 1997. Генетико-биохимические особенности преадаптации млекопитающих к окислительному стрессу: Автореф. канд. дис. Ростов-на-Дону, 30 с.
3. Владимиров Ю. А., 1993. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — Москва: Наука, 150 с.
4. Владимиров Ю. А., Азизова О. А., Деев А. И., 1991. Свободные радикалы в живых системах // Итоги науки и техники. Сер. «Биофизика». Т. 29. С. 156–162.

5. Владимиров Ю. А., 1994. Три гипотезы о механизме действия лазерного облучения на клетки и организм человека // Эфферентная медицина. С. 51–67.
6. Гаркави Л. Х., Квакина Е. Б., Уколова М. А., 1990. Адаптационные реакции и резистентность организма. — Ростов-на-Дону: Изд-во Ростов. ун-та, 224 с.
7. Гуськов Е. П., Лукаш А. И., 1987. Избыточность фенотипа, кислородный мутагенез и концепция протекторного катаболизма. М., 1987. 24 с. Деп. в ВИНТИ № 95143.
8. Гуськов Е. П., Тимофеева И. В., Милютин Н. П. и др., 1999. Влияние гипербарической оксигенации на антиоксидантный статус *Xenopus laevis* после предварительной адаптации к кислороду // Онтогенез. Т. 30. № 2. С. 91–96.
9. Гуськов Е. П., Шкурат Т. П., 1985. Цитогенетические последствия гипербарической оксигенации в ряду клеточных циклов лимфоцитов периферической крови человека // Генетика. Т. 21. № 8. С. 68–75.
10. Гуськов Е. П., Шкурат Т. П., Беличенко Н. И., Казанцева Н. В., 2000. Моделирование цитогенетических последствий гипербаротерапии на пролиферирующих тканях животных // Материалы докладов IV Всеармейской научно-педагогической конференции с международным участием «Баротерапия в комплексном лечении и реабилитации раненых, больных и пораженных» 24–25 мая 2000 г. Санкт-Петербург, 179 с.
11. Дарлингтон С. Д., Ла Кур Л. Ф., 1980. Хромосомы. Методы работы. — М.: Атомиздат, 250 с.
12. Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньщикова Е. Б., 2001. Окислительный стресс. — М.: Наука / Интерпериодика, 343 с.
13. Лакин Г. Ф., 1990. Биометрия. — М.: Высшая школа, 351 с.
14. Меерсон Ф. З., 1981. Адаптация, стресс и профилактика. — Москва: Наука, 278 с.
15. Оленов Ю. М., 2002. Эпигеномная изменчивость // Онтогенез. Т. 1. № 1. С. 10–16.
16. Опритов В. А., Пятыгин С. С., Крауз В. О., 1993. Анализ роли электрической активности клеток высшего растения в развитии адаптационного синдрома при охлаждении // Физиология растений. Т. 40. С. 619–626.
17. Птицын Л. Р., 1996. Билюминесцентный анализ SOS-ответа клеток *Escherichia coli* // Генетика. Т. 32. № 3. С. 354–358.
18. Ригер Р., Михаэлис А., 1967. Генетический и цитогенетический словарь, пер. с нем. М., 350 с.
19. Руттен М. Я., 1973. Происхождение жизни. — Москва: Мир, 412 с.
20. Тимофеева И. В., 1997. Генетико-биохимические особенности реакции *Xenopus laevis* на окислительный стресс: Автореф. канд. дис. Ростов-на-Дону, 30 с.
21. Ames B. N., Cathcart R., Schwiers E., Hochstein P., 1981. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical-caused aging and cancer: A hypothesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 78. N 11. P. 6858–6862.
22. Ames B. N., Shigenaga M. K., 1992. Oxidants are a major contributor to aging // Ann. N. Y. Acad. Sci. Vol. 663. P. 85–96.
23. Arai J., Li S., Hartley D., Feig L., 2009. Transgenerational rescue of a genetic defect in long-term potentiation and memory formation by juvenile enrichment // J Neurosci. Vol. 29. N 5. P. 1496–502.
24. Brown W. M., Prager E. H., Wang A., Wilson A. C., 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates; tempo and mode of evolution // J. Mol. Evol. V. 18. N 1. P. 225–239.
25. Bunout D., Cambiazio V., 1999. Nutrition and aging // Rev Med Chil. Vol. 127. N 1. P. 82–88.
26. Chiu D. T. Y., Kuypers F. A., Lubin B., 1989. Lipid peroxidation in human red cells. // Semin Hematol. Vol. 26. P. 257–276.
27. Chiu D. T. Y., Liu T. Z., 1997. Free radical and oxidative damage in human blood cells // J. Biomedical Scienc. N 4. P. 256–259.
28. Dennog C., Hartmann A., Frey G. et al., 1996. Detection of DNA damage after hyperbaric oxygen (HBO) therapy // Mutagenesis. N 11. P. 605–609.
29. Fekete A., Emri T., Gyetvai A., et al., 2007. Development of oxidative stress tolerance resulted in reduced ability to undergo morphologic transitions and decreased pathogenicity in a t-butylhydroperoxide-tolerant mutant of *Candida albicans* // FEMS Yeast Res. N 7. P. 834–47.
30. Jackson A., Chen R., Loeb L., 1998. Induction of microsatellite instability by oxidative DNA damage // Proc Natl Acad Sci. V. 95 (21). P. 12468–73.
31. Joenje H., van den Berg J., van Rijn J., 1985. Lack of cross-resistance to X-irradiation in oxygen-resistant mammalian cell lines // J Free Radic Biol Med. V. 1. N 4. P. 307–310.
32. Kang C., Kristal B., Yu B., 1999. Age-related mitochondrial DNA deletions — effect of dietary restriction // Free radical biology and medicine. Vol. 27. N 3–4. P. 148–154.
33. Klein M. B., Chan P. H., Chang J., 2003. Protective effects of superoxide dismutase against ischemia-reperfusion injury: development and application of a transgenic animal model // Plast Reconstr Surg. Vol. 111. N 1. P. 251–255.
34. Luk'ianova L. D., 2003. Molecular mechanisms of tissue hypoxia and organism adaptation // Fiziol Zh. Vol. 49. P. 17–35.
35. Melov S., Schneider J. A., Day B. J., Hinerfeld D. et al., 1998. A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase // Nat Genet. Vol. 18. P. 99–100.
36. Nanney D. L., 1958. Epigenetic control systems // Proc. Natl Acad. Sci., Wash. N 44. P. 712–717.
37. Patel B. N., David S., 1997. A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is

- expressed by mammalian astrocytes // J Biol Chem. N 272. P.20185–20190.
38. Rothfuss A., Dennog C., Speit G., 1998. Adaptive protection against the induction of oxidative DNA damage after hyperbaric oxygen treatment // Carcinogenesis. N 19. P.1917–1921.
39. Saada H. N., Said U. Z., Meko N. H. et al., 2008. Grape seed extract *Vitis vinifera* protects against radiation-induced oxidative damage and metabolic disorders in rats // Phiother Res. N. 11. P.341–346.
40. Sagan L., 1967. On the origin of mitosing cells. // J.Theoret. Biol. N 14. P.225–274.
41. Samson L., Cairns J., 1977. A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli* // Nature. Vol.267. N5608. P.281–283.
42. Sasazuki S., Hayashi T., Nakachi K. et al., 2008. Protective effect of vitamin C on oxidative stress: a randomized Controlled trial // Int J Vitam Nutr Res. Vol.78. N3. P.121–128.
43. Singh K., 2004. Mitochondria damage checkpoint in apoptosis and genome stability // FEMS Yeast Res. N 2. P.127–132.
44. Speit G., 1998. Adaptive protection against the induction of oxidative DNA damage after hyperbaric oxygen treatment // Carcinogenesis. N 19. P.1913–1917.
45. Strehl R., Schumacher K., Minuth W., 2004. Controlled respiratory gas delivery to embryonic renal epithelial explants in perfusion culture // Tissue Eng. Vol.10. P.1196–203.
46. Surani M. A., 1993. Silence of the genes // Nature Vol.366. P.302–303.

Mutational processes in animals preadapted to oxidizing stress

E. P. Gus'kov, E. V. Mashkina, N. I. Belichenko, T. V. Varduny, G. I. Volosovcova, G. E. Gus'kov, T. P. Shkurat

✪ **SUMMARY:** Article is devoted to a problem of metabolic systems preadaptation an organism as a result of influence oxidizing stress, induced hyperbaric oxygenation (0,2 MPa), on newborn rats, and also an estimation of a degree and duration of preservation of a metabolic trace after that influences. Opportunities of increase stability animals to influence stress modes of oxidizing stress, induced hyperbaric oxygenation (0,5 MPa) after their preadaptation during the newborn period are considered. Mutational processes in different periods after preadaptation are investigated; changes of norm reaction to oxidizing stress in the posterity received from reciprocal crossings of preadapted rats are estimated.

✪ **KEY WORDS:** preadaptation; adaptation; oxidizing stress; aberrations of chromosomes; SOS-lux test; stress influences; maternal inheritance; hyperbaric oxygenation 0,2 MPa.

Информация об авторах

Машкина Елена Владимировна — доцент.
НИИ биологии при ГОУ ВПО Южный федеральный университет.
344104 Россия, Ростов-на-Дону, пр. Стачки 194/1.
E-mail: niib@svedu.ru

Беличенко Нина Ивановна — доцент.
НИИ биологии при ГОУ ВПО Южный федеральный университет.
344104 Россия, Ростов-на-Дону, пр. Стачки 194/1.
E-mail: niib@svedu.ru

Вардун Татьяна Викторовна — профессор.
НИИ биологии при ГОУ ВПО Южный федеральный университет.
344104 Россия, Ростов-на-Дону, пр. Стачки 194/1.
E-mail: Varduny@yandex.ru

Волосовцова Г. И. — ассистент кафедры генетики.
ГОУ ВПО Южный федеральный университет.
344104 Россия, Ростов-на-Дону, пр. Стачки 194/1.
E-mail: niib@svedu.ru

Покудина Инна Олеговна — научный сотрудник.
НИИ биологии при ГОУ ВПО Южный федеральный университет.
344104 Россия, Ростов-на-Дону, пр. Стачки 194/1.
E-mail: niib@svedu.ru

Гуськов Глеб Евгеньевич — научный сотрудник.
НИИ биологии при ГОУ ВПО Южный федеральный университет.
344104 Россия, Ростов-на-Дону, пр. Стачки 194/1.
E-mail: niib@svedu.ru

Гуськов Евгений Петрович — д. б. н., профессор, директор НИИ биологии, зав. кафедрой генетики Ростовского государственного университета.

Шкурят Татьяна Павловна — профессор.
НИИ биологии при ГОУ ВПО Южный федеральный университет.
344104 Россия, Ростов-на-Дону, пр. Стачки 194/1.
E-mail: tshkurat@yandex.ru

Mashkina Elena Vladimirovna — associate professor.
Institute of Biology of Southern Federal University
344104 Russia, Rostov-on-Don, Stachki av. 194/1.
E-mail: niib@svedu.ru

Belichenko Nina Ivanovna — associate professor.
Institute of Biology of Southern Federal University
344104 Russia, Rostov-on-Don, Stachki av. 194/1.
E-mail: niib@svedu.ru

Varduni Tat'yana Viktorovna — professor
Institute of Biology of Southern Federal University
344104 Russia, Rostov-on-Don, Stachki av. 194/1.
E-mail: Varduny@yandex.ru

Volosovcova G. I. — assistant professor.
Southern Federal University
344104 Russia, Rostov-on-Don, Stachki av. 194/1.
E-mail: niib@svedu.ru

Pokudina Inna Olegovna — scientist.
Institute of Biology of Southern Federal University
344104 Russia, Rostov-on-Don, Stachki av. 194/1.
E-mail: niib@svedu.ru

Gus'kov Gleb Evgen'evich — scientist.
Institute of Biology of Southern Federal University
344104 Russia, Rostov-on-Don, Stachki av. 194/1.
E-mail: niib@svedu.ru

Gus'kov Evgeniy Petrovic — d. b. s., professor, director of the Institute of Biology, head of the Genetics department of Rostov State University.

Shkurat Tat'yana Pavlovna — professor.
Institute of Biology of Southern Federal University
344104 Russia, Rostov-on-Don, Stachki av. 194/1.
E-mail: tshkurat@yandex.ru