

УДК 591.33:577.334

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ТЕХНОГЕННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ

© 2017 г. О. П. Мелехова

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет  
119234 Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12

E-mail: muffs2013@gmail.com, muffs2003@gmail.com

Поступила в редакцию 29.08.2016 г.

Статья посвящена анализу проблемы биобезопасности с точки зрения закономерностей индивидуального развития. Ранее нами показана ключевая роль эпигеномных свободнорадикальных (СР) процессов в нормальном эмбриональном развитии низших позвоночных в процессах формирования компетенции и детерминации эмбриональных зачатков, а также обнаружен значительный рост интенсивности СР-процессов перед каждым качественным изменением гомеостатических механизмов в развивающихся организмах: в индукционных системах, перед вылулплением зародыша из оболочек, при подготовке к метаморфозу. Таким образом активация СР-процессов в эмбриональных зачатках соответствует состоянию неустойчивости и характеризует “критические периоды развития” и повышенную чувствительность зародыша к факторам среды. Представлены запатентованные методы и тест-система, позволяющая обнаружить ранние биологические эффекты слабых средовых воздействий и прогнозировать их экологический риск. Обсуждаются возможные механизмы значительных биологических эффектов слабых радиационных и химических воздействий на развивающиеся организмы. Обосновывается необходимость включения эмбриональных объектов в регламент испытаний биобезопасности технологических разработок.

**Ключевые слова:** низшие позвоночные, эмбрионы, личинки, свободные радикалы, биобезопасность, слабые воздействия, тест-система

**DOI:** 10.7868/S0475145017010086

### ВВЕДЕНИЕ

Проблемы биобезопасности весьма актуальны в связи с экспоненциальным ростом антропогенного загрязнения биосферы. Показательны следующие справочные данные: рост электромагнитных загрязнений по неионизирующим излучениям за 150 лет составляет 12000 раз, по ионизирующим излучениям – 1.5–2 раза, новых ксенобиотиков – продуктов химических технологий – появляется порядка тысячи наименований в год. При этом важно изучение механизмов биологических “эффектов малых доз”, т.к. современное состояние биосферы характеризуется повсеместным хроническим интегральным электромагнитным и химическим воздействием в малых и умеренных дозах на живые организмы во всех средах обитания.

Быстрое развитие биотехнологических и биомедицинских разработок привело к открытию новых перспектив повышения благосостояния и продления жизни человека. Однако эффекты взаимодействия организмов и в целом природной среды с продуктами новых технологий не всегда

предсказуемы. В настоящее время очень актуальны исследования этих эффектов не только на моделях, близких к человеку, но также и прогнозирование экологического риска. В частности, International Life Science Institute Research Foundation/Risc Science Institute предлагает некоторые стандартные направления скрининга риска действия новых продуктов на биологические модели *in vitro* и *in vivo*, в том числе на альтернативных организмах и клеточных моделях.

Биологическую безопасность понимают как сохранение живыми системами своей биологической сущности, основных свойств и системообразующих связей и предотвращение потери биологической целостности. Применительно к развивающимся организмам это означает сохранность генетической информации и гомеостаза развития, последовательных этапов экспрессии генов и образования структуры организма. Традиционно безопасность среды обитания организмов оценивают, нормируя предельно допустимые концентрации и уровни техногенных воздействий. Однако

мы отметили, что уровни химических и электромагнитных воздействий, считающиеся безопасными для взрослых животных, являются критичными для развивающихся эмбрионов и молоди тех же видов (Мелехова, 1976; Melekhova et al., 1998).

В данной статье будут приведены обоснования необходимости пересмотра системы нормирования предельно допустимых негативных воздействий, а также необходимость использования эмбриональных биотестов в испытаниях безопасности новых биотехнологических и биомедицинских разработок. Обсуждение этой проблемы ведется в контексте новых данных и результатов наших многолетних исследований.

Эмбриогенез представляет собой первый этап развития различных многоклеточных организмов. Отличительная черта этого периода индивидуальной жизни в том, что все первичные процессы становления клеточного разнообразия и начальный морфогенез осуществляются в соответствии с единой генетической программой оплодотворенной яйцеклетки и на основе энергетического потенциала и регуляторных макромолекул, содержащихся в ее цитоплазме. Эмбриональные биотесты имеют уникальные преимущества для исследования сохранности генетической информации. Сохранность всей полноты генетической информации может быть обнаружена именно в раннем онтогенезе, т.к. многие важнейшие для сохранения популяции гены экспрессируются в этот период. Кроме того, в начальном периоде эмбриогенеза происходит закономерная смена регуляторных механизмов генной экспрессии. Удобным объектом для изучения онтогенетических эффектов техногенных воздействий являются эмбрионы амфибий, в частности — лабораторной линии африканской шпорцевой лягушки. Эмбриональный материал можно получать в заданные сроки, стимулируя созревание половых продуктов гормональными инъекциями. Таким образом можно обеспечить достаточное количество генетически однородного материала. Этот объект достаточно хорошо изучен, известно время начала экспрессии основных генов аксиализации зародыша. Первый этап включения генной экспрессии связан с оплодотворением и заключается в активации процессов на уровне трансляции: активация продуктов материнских генов, неравномерно распределенных в цитоплазме оплодотворенного яйца. Следующим уровнем регуляции является включение транскрипционной функции ядер. При этом закономерное пространственное распределение обоих этих процессов определяет будущий план строения эмбриона — расположение основных отделов тела. Эта пространственная закономерность в свою очередь связана с биохимической неоднородностью цитоплазмы яйца, с развитием процессов свободнорадикального окисления в мембранах цитоплазматических органелл (Мелехова, Коссова, 1997).

У низших позвоночных вышеупомянутые процессы активации генной экспрессии происходят в предгастрულიационном периоде и определяют наступление и правильный ход гастрულიации. Перед гастрულიацией активируются также ряд генов, определяющих дорсализацию эмбриона и формирование осевого зачатка и нервной системы у всех позвоночных животных. Все это происходит в промежутке времени от стадии средней бластулы до начала гастрულიации. Если произошло нарушение регуляции — это легко визуализируется через несколько часов: гастрულიация не наступает или идет с искажением пространственных закономерностей. Такие аномальные зародыши гибнут.

Развитие живой системы приводит не только к изменению ее структурно-функциональных особенностей, но и к регуляции ее энергетического состояния. Нами был выбран один из показателей клеточного метаболизма: уровень свободно-радикальных процессов. Можно считать, что этот показатель отражает скорость энергетического протока в клетке, поскольку свободные радикалы генерируются как в ферментативных, так и в неферментативных процессах биологического окисления, включенных в клеточный энергообмен (Бурлакова и др., 2001). Ранее нами было показано участие СР-процессов в эпигеномной регуляции развития у низших позвоночных (Мелехова, Коссова, 1997). Окислительно-восстановительные процессы, протекающие в организме с участием свободных радикалов — активных форм кислорода (АФК) — привлекают в последние годы большой интерес. Предполагают, что АФК могут играть сигнальную роль, определяя реакцию клетки на средовые воздействия. Свободные радикалы возникают в нормальном метаболизме, а также характеризуют ранние этапы повреждения клеток при любых патологиях (“окислительный стресс”). В последующих фазах клеточного ответа радикалы рекомбинируют, цепные процессы обрываются. Свободные радикалы участвуют в интеграции клеточного метаболизма также и благодаря энергетическим особенностям реакций с их участием. АФК генерируются в различных функциональных отсеках клетки, они быстро взаимодействуют друг с другом, взаимопревращаясь, а также индуцируя в химических компонентах клетки (белках, нуклеиновых кислотах, углеводах, липидах) образование свободнорадикальных состояний и перекисей (Козлов, 1973). При окислительных процессах генерируется энергия электронного возбуждения, которая при определенных условиях может безизлучательно переноситься по системе быстро, на значительные расстояния, и впоследствии либо излучаться, либо тратиться на совершение физической или химической работы. Система окислительно-восстановительных процессов составляет основу жизнедеятельности клетки и организма (Бурлакова и др., 2001). В последние годы развиваются представления о системе окислительно-

восстановительного гомеостаза клетки и об информационной роли СР в этой системе. Речь идет о единой прооксидантно-антиоксидантной системе, включающей механизмы управления клеточным метаболизмом через физико-химические изменения мембран (Козлов, 1973; Бурлакова и др., 2001, 2003).

В данной работе использована наша гипотеза пространственно-временной “эпигенетической” программы эмбриогенеза, заложенной в цитоплазме зиготы соотношением субстратов, промоторов и ингибиторов свободнорадикального окисления. Гипотеза основана на обнаруженных нами явлениях: первые центры организации в зародыше (центры Ньюкупа и Шпеманна) возникают путем развития с ускорением и самоорганизации электронно-возбужденных состояний в цитоплазме в результате “дыхательного взрыва” оплодотворения; появление и усиление радикалообразования в ядрах предвещает начало транскрипционной функции ядер; в индукционных системах индуктором является зачаток с более активным радикалообразованием; при контакте активируется радикалообразование в реагирующем зачатке; состоянию компетенции соответствует активация радикалообразования в реагирующем зачатке индукционной системы. В реагирующем зачатке область активного радикалообразования локализуется в зоне контакта; детерминация эмбриональных зачатков характеризуется высоким уровнем радикалообразования в ядрах; при инициации процессов терминальной дифференцировки основная радикалообразующая функция переходит к митохондриям; связь с метаболизмом фосфоинозитидов (Мелехова, 2010). Реализация плана строения эмбриона связана с последовательностью свободнорадикального окисления энергосубстратов зиготы (желточных гранул), первоначально иницируемой “дыхательным взрывом” на плазматической мембране при контакте со спермием.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований послужили зародыши амфибий и костистых рыб; основной объект — эмбрионы и ранние личинки бесхвостых земноводных (*Rana temporaria* Linnaeus, 1758 и *Xenopus laevis* Daudin, 1802). В экспериментальном исследовании механизмов регуляции эмбриогенеза принципиальным является выбор измеряемого показателя. В нашей работе для выявления общего уровня СР-реакций использован радиоиндикаторный метод привитой сополимеризации (ПС), основанный на высокой реакционной способности СР (Dröge, 2002). Метод позволяет оценить относительную концентрацию СР в живой клетке и ее органеллах, ее изменения при различных воздействиях на организм методами радиометрии или автордиографии, а также

выявить гистологическую локализацию меченых привитых сополимеров. Метод высокочувствителен и дает возможность сравнивать относительные суммарные концентрации СР в небольших группах клеток, что обуславливает перспективность его применения на эмбриологических объектах. Поскольку уровень СР-реакций измеряется за время инкубации живого объекта в присутствии индикатора (в наших опытах — от 1 до 3-х часов), то таким образом оценивается макродинамика сверхбыстрых, хаотичных СР-процессов в клетках.

Использована чувствительная тест-система: объект — эмбрионы амфибий на одной из ранних критических стадий развития; тест-реакция — измерение сдвига уровня СР-процессов в ранние сроки после воздействия, а также регистрация более позднего биологического эффекта: наличие и характер аномалий развития, процент и сроки смертности, синхронность развития (Melekhova et al., 1998; Мелехова, Коссова, 1997; Мелехова, 2009).

Выбор тест-объектов основывался на полученных ранее нами данных о значении активизации СР-процессов на разных стадиях раннего развития низших позвоночных как перmissive фактора детерминации эмбриональных зачатков.

В наших работах с применением этого метода было показано участие СР-процессов в общей динамике развития эмбриона, в детерминации эмбриональных зачатков органов, в индукционных системах. Общий уровень СР-реакций хорошо отражает интегральную скорость окислительного метаболизма клетки и физико-химическое состояние мембран (что существенно для их реактивности). СР-реакции очень чувствительны к различным родам внешним воздействиям на клетку.

На биологическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова разработана, запатентована и применяется в экологической экспертизе и оценке биобезопасности технология экспрессной детекции биологического эффекта малых доз электромагнитных излучений (ЭМИ). В основе технологии лежит измерение адаптационного стресса чувствительных тест-объектов в ранние сроки после воздействия с последующей проверкой надежности заключения по характеру отсроченных биологических эффектов. Адаптационный окислительный стресс полуколичественно оценивали по сдвигу уровня свободнорадикальных (СР) процессов, применяя метод привитой сополимеризации радиоактивного индикатора  $^{14}\text{C}$  (AA- $^{14}\text{C}$ ). Метод основан на высокой реакционной способности метаболических свободных радикалов (СР), а также СР-окислительного стресса.

Для выяснения биохимических механизмов участия СР-процессов в пространственно-временной регуляции эмбриогенеза мы предприняли исследование субклеточной локализации и биохимических субстратов СР-реакций в эмбриональном периоде (детерминация зачатков) и ли-

чиночном (дифференцировка) (Мелехова, Косова, 1997).

Исследовали включение метки при радикальной сополимеризации в субклеточные фракции ядер, митохондрий и желточных гранул, выделенные методом дифференциальной седиментации. Обнаружили, что в эмбриональном периоде наиболее интенсивно радикалообразование в ядрах, в личиночном — в митохондриях. При изменении уровня радикалообразования во фракциях липидов, РНП, ДНП и белков отмечено преимущественное участие СР-реакций в липидном обмене, причем главным образом — во фракции полифосфоинозитидов. Фосфоинозитиды осуществляют внутриклеточную передачу внешних сигналов от мембранных рецепторов к ядерным и цитоплазматическим эффекторам и определяют режим функционирования клетки (Мелехова, 2010). Эти сведения также проясняют механизм взаимодействия свободнорадикальных эпигенетических процессов и экспрессии генов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранее нами впервые на эмбриональных объектах (с применением вышеуказанного экспериментального подхода) обнаружен универсальный неспецифический механизм детерминации, включающий развитие свободнорадикальных реакций и лежащий в основе повышенной чувствительности — активное локальное развитие свободнорадикальных процессов (Мелехова, 1976, 2010).

По нашим данным, наибольшая чувствительность зародыша и его зачатков к повреждающим факторам (рентгеновскому и лазерному облучению, химическим и гравитационным воздействиям) характеризует детерминирующиеся группы клеток, отличающиеся в норме повышенным уровнем радикалообразования.

Можно заключить, что клеточные энергетические процессы, определяющие также физико-химическое состояние мембранного аппарата клетки, являются важнейшим фактором, определяющим неустойчивое состояние, чувствительность системы к специфическими управляющим стимулам и затем — готовность к перестройке всей рабочей системы синтеза белка в клетке.

Рассмотренный в этой статье экспериментальный подход позволил нам исследовать механизмы чувствительности эмбриональных клеток к различным повреждающим факторам: рентгеновскому и локальному лазерному облучению, химическим воздействиям, измененным гравитационным условиям.

Обнаружено, что механизмы чувствительности у эмбриональных объектов универсальны при действии факторов различной природы. Эти результаты обсуждены с позиций принятых в биофизике представлений об окислительном стрессе

и его адаптационном значении. В этих экспериментах повреждающие факторы используются как инструмент для изучения процессов детерминации. Показано, что периоды квазихаотического поведения системы являются наиболее чувствительными к внешним воздействиям. На основании этих экспериментов формирование повышенной чувствительности можно связать с определенным состоянием мембранного аппарата клеток и с формированием в эмбриональных зачатках свойства компетенции, необходимого для восприятия информационных сигналов, инициирующих дифференцировку (Мелехова, 2010). Прослежен генезис аномалий развития, причинно связанных с нарушением детерминационных процессов, и продемонстрирована возможность использовать модификации морфогенеза как средства оценки токсичности природной окружающей среды.

На основании наших экспериментов разработаны и запатентованы способ биоиндикации загрязнений водной среды, способ оценки эмбриотоксичности среды, способ оценки криоповреждений репродуктивного материала при консервации геномов. Было показано, что химические воздействия солей тяжелых металлов в витальных концентрациях на порядок ниже считающихся предельно допустимыми являются критичными для эмбрионов и личинок гидробионтов. На графиках “доза — эффект” отмечены отчетливые максимумы в области малых ( $10^{-5}$  мг/л) и средних (0.1–1 мг/л) доз, разделенных “мертвой зоной”, в которой эффект не обнаруживается (Падалка, 2006). Такие “бимодальные” дозовые кривые характерны для парадоксальных эффектов малых доз, которые интенсивно исследуются в настоящее время и обычно объясняются сбоями в функции мембранных и внутриклеточных сигнальных систем.

Биологические эффекты действия  $\gamma$ -излучения препаратов  $^{60}\text{Co}$  в дозе около  $10^{-4}$  Гр, однократного рентгеновского облучения в дозе 0.1 Гр, комплексных электромагнитных воздействий сотового телефона (5 мин) и монитора персонального компьютера (1 час) вызывает достоверное резкое изменение (свыше 30–50% от контроля) уровня СР-реакций в первые часы и в дальнейшем появление характерных аномалий развития и гибель части эмбрионов (Падалка, 2006). Экологическим последствием хронического воздействия слабых доз химических и электромагнитных воздействий является снижение численности популяций гидробионтов и нарушение экологического равновесия в водоемах. Мы использовали этот метод также для исследования возможности волновых коммуникаций между организмами. Результаты опытов свидетельствуют о том, что СР-реакции участвуют в биологической детекции бесконтактных взаимодействий организмов (Мелехова, 2009).

Можно предположить, что обнаруженные нами процессы лежат в основе механизма исчезновения многих видов животных и растений в результате техногенного пресса. Этот механизм ведет к снижению численности популяций (вплоть до возможного исчезновения) тех видов, эмбриональные стадии которых постоянно подвергаются слабым химическим или физическим техногенным влияниям. При хроническом воздействии слабо возмущенной среды на развивающиеся организмы новые поколения животных обладают повышенной чувствительностью к повреждающим факторам. Дополнительное воздействие, например, аномальной температуры, влажности или другого природного фактора приводит к гибели таких сенситивизированных организмов (как и было показано в наших опытах) (Мелехова, 2010). С другой стороны, развивающиеся организмы обладают и дополнительными адаптационными резервами — например, за счет иерархии индукционных систем, обеспечивающих в эмбриогенезе развитие жизненно важных систем организма (осевого зачатка, нервной системы). За счет таких адаптационных механизмов слабые повреждения, небольшие аномалии могут компенсироваться.

Таким образом, ответ на хроническое воздействие слабых доз физических, химических факторов или их сочетаний не строго детерминирован, индивидуален, что и демонстрирует некоторые механизмы естественного отбора. Можно предположить, что обнаруженные нами явления носят универсальный характер и приближают нас к пониманию механизмов изменений репродуктивной способности и адаптивных резервов животных и людей в условиях современной биосферы.

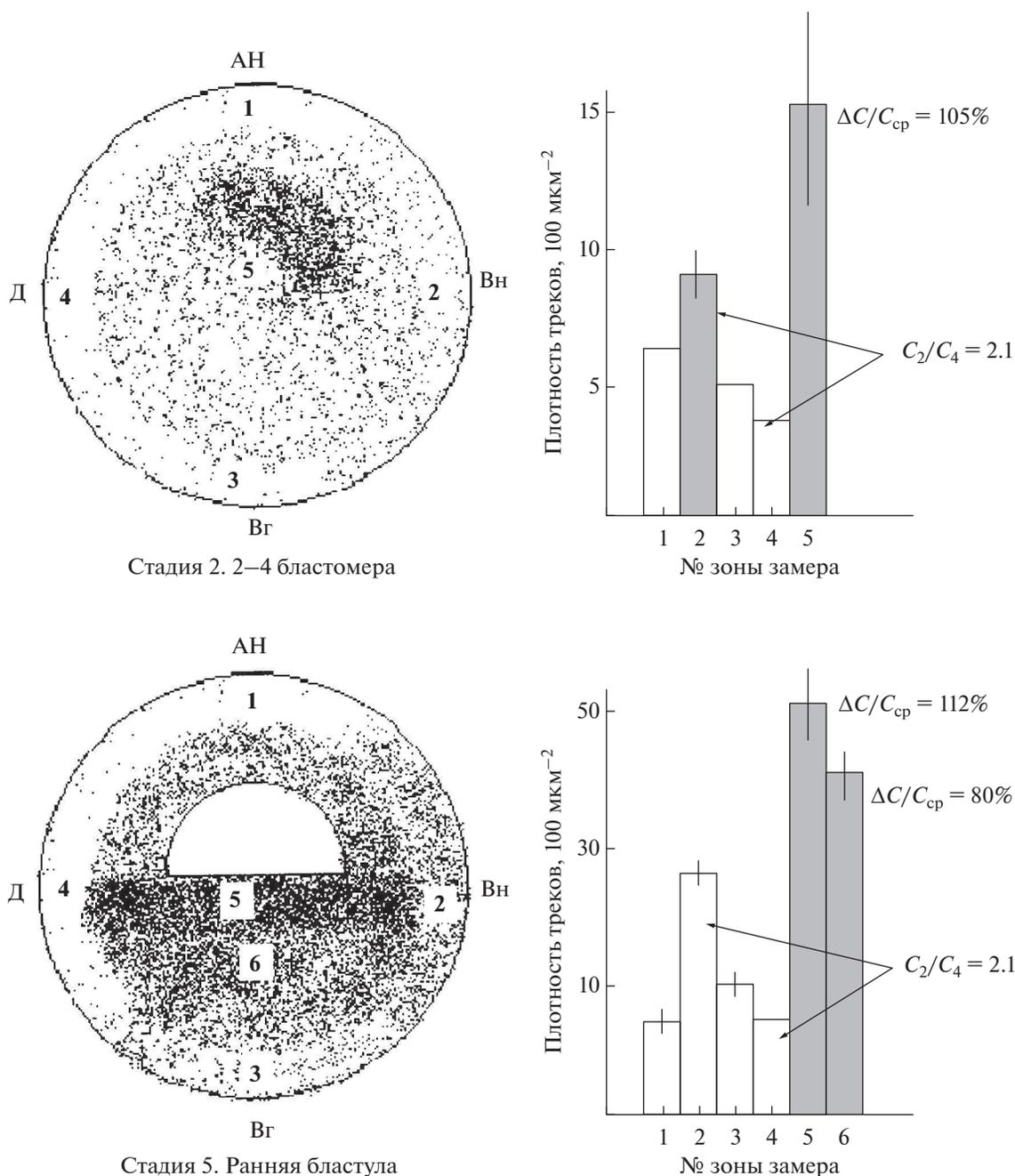
Ранее нами подробно исследована динамика и региональность свободнорадикальных (СР) реакций в раннем развитии бесхвостых амфибий с использованием методов привитой сополимеризации (ПС) и автордиографии (Мелехова, 2010). После оплодотворения зона СР-реакций в цитоплазме зиготы смещается к центральной части, растет размах флуктуаций интенсивности СР-реакций в цитоплазме, затем со стадии морулы резко возрастает уровень СР-реакций в ядрах, область наиболее активного радикалообразования соответствует местоположению индукционного центра Ньюкупа (Гилберт, 2010) (рис. 1). Позже (на стадии средней бластулы) в этой же области активизируется и резко возрастает транскрипционная функция ядер (Гилберт, 2010) и клетки презумптивной мезодермы приобретают способность к подвижности (Гилберт, 2010). Выше было указано, что мы обнаружили значительное участие СР-реакций в системе вторичных внутриклеточных мессенджеров — фосфоинозитидов. Известно, что фосфоинозитиды локализованы как в плазматических, так и в ядерных мембранах (Мелехова, 2010) (рис. 2). Таким образом, начало транскрипционной функции собственного генома зароды-

ша, возможно, инициируется высоким уровнем ядерного радикалообразования, в значительной мере связанным с активацией фосфоинозитидной системы. Для проверки этого предположения были проведены опыты с использованием ингибитора СР-реакций ионола в концентрации  $10^{-3}$  М. Воздействие ионола на стадии бластулы прекращает развитие зародыша: гастрюляция не происходит, хотя гибель отсрочена.

В другой серии опытов на бластулы воздействовали биологически активным веществом метилурацилом фармакопейным в малой концентрации  $10^{-4}\%$  на зародыши на стадии бластулы в течение 24-х часов; это привело к повышению уровня СР-процессов на 33% и замедлению развитию в 3 раза по сравнению с контрольной группой эмбрионов. Отметим, что метилурацил не является отравляющим веществом, в медицине используется для заживления ран, стимулируя пролиферацию. На зародыши более поздних стадий развития действие метилурацила не приводило к замедлению развития. Можно заключить, что стадия бластулы является критической (сверхчувствительной) для начала гастрюляционных морфогенетических событий, связанных с активностью многих генов, пермиссивным фактором экспрессии которых является активное ядерное радикалообразование. Даже слабое химическое воздействие извне на эмбрионы приводит в это время к нарушению естественной регуляции, связанной с удлинением клеточных циклов в презумптивной энтодерме.

Следующий по времени этап формирования осевого зачатка у амфибий связан с гастрюляционным перемещением клеточного материала хордомезодермального зачатка и его индукционным взаимодействием с презумптивным нейробластом. Наши исследования динамики распределения СР-реакций в зародыше показали, что в цитоплазме и ядрах презумптивной нейроэктодермы уровень СР-реакций низкий, вплоть до начала гастрюляции (рис. 1, ст. 5). После контакта с хордомезодермальным зачатком происходит активация СР-процессов как в цитоплазме, так и в ядрах нейроэктодермы. Во время гастрюляции по активности радикалообразования выделяются организационные центры Ньюкупа в эндотерме и Шпеманна (дорсальная губа бластопора).

Результаты тестирования сравнительной чувствительности *гаструл* амфибий к химическим воздействиям показали, что концентрации сульфата меди, определяемые санитарными правилами для рыбохозяйственных водоемов как допустимые (0.004 мг/л), вызывают отклонения от физиологического уровня СР-реакций на 43% и гибель 60% эмбрионов в течение 48 ч. Воздействие сульфата меди в концентрации 0.0004 мг/л (0.1 ПДК) также вызывает заметное повышение уровня СР-реакций в первые 90 мин и гибель 20%



**Рис. 1.** Региональность СР-реакций у зародышей травяной лягушки (данные автордиографии на срезе). Слева – схема среза зародыша на ранних стадиях развития. Интенсивность штриховки на схемах качественно отражает отличие концентрации СР в соответствующем участке от среднего уровня этой концентрации по всему срезу. АН–Вг – анимально-вегетативная ось зародыша. Д–Вн – дорсо-вентральная ось зародыша. Справа – гистограмма распределения концентрации зерен восстановленного серебра (треков). Цифры над гистограммами указывают процентное отличие концентрации зерен в данном участке от среднего уровня.

эмбрионов в течение 48 ч инкубации в испытуемой среде.

Еще более токсичным для эмбрионов амфибий на стадии гаструлы оказался хлористый литий. Концентрация 0.15 мг/л, определяемая санитарными правилами как предельно допустимая

для рыбохозяйственных водоемов, оказалась летальной для 100% гаструл амфибий в течение 48 ч, уже в первые 90 мин инкубации вызвав повышение уровня СР-реакций на 70% по сравнению с контролем. 0.1 ПДК (0.015 мг/л) также оказалась летальной для 50% гаструл амфибий и приводила

к сдвигу уровня СР-реакций на 110% в сравнении с контролем. Присутствие солей меди и лития в природных водоемах естественно (в низких фоновых концентрациях). В приведенных примерах существенную роль играет высокая чувствительность тест-объекта, во многом зависящая от состояния конституционального повышения уровня СР-процессов в местах локализации важнейших индукционных систем (центров Ньюкупа и Шпеманна), определяющих ход дальнейшего развития эмбрионов.

Мы исследовали также воздействие заведомо токсичных ксенобиотиков: ДДТ и хлорорганического пестицида атразина, используемого в сельском хозяйстве как гербицид. Атразин считается умеренно токсичным для млекопитающих и человека. Широкое применение этого недорогого гербицида в хозяйствах привело к повсеместному загрязнению грунтовых вод. В Европе в ряде стран атразин запрещен. Согласно “Единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору” ПДК атразина в воде составляет 0.002 мг/дм<sup>3</sup> (2 мкг/л), для рыбохозяйственных водоемов – 0.005 мг/л. В наших опытах инкубация гаструл амфибий в воде, содержащей 0.0005 мг/л (т.е. 0.1 ПДК) атразина приводила через 90 мин к повышению на 90% уровня СР-реакций и затем к быстрой гибели 100% зародышей.

При внесении следов ДДТ в среду инкубации также происходил рост уровня СР-реакций у гаструл амфибий и быстрая гибель 100% подопытных зародышей.

ДДТ – хлорорганический инсектицид, в настоящее время запрещенный, но уже распространившийся по всей планете благодаря своей исключительной химической стойкости и способности мигрировать по средам жизни и аккумулироваться по пищевым цепям. Уже через несколько лет после начала применения ДДТ его содержание в подкожной клетчатке людей достигло 20–30 мг/кг. В Российской Федерации и в странах Таможенного Союза содержание ДДТ в пищевых продуктах регламентировано техническими регламентами. В санитарно-эпидемиологических документах ПДК ДДТ в водоемах определена 0.1 мг/мл.

Таким образом последние два органических загрязнителя сейчас распространены повсеместно, опасны для человека и определяются достаточно дорогими и сложными методами (хроматография и иммуноферментный анализ). Биотестирование с помощью эмбриональных объектов помогает однозначно определить их присутствие в концентрациях более низких, чем считающиеся предельно допустимыми.

Удобной для биотестирования химических и радиационных воздействий в слабых дозах оказа-

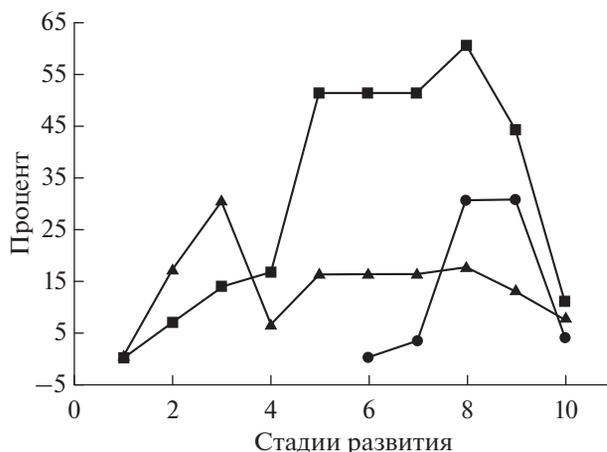


Рис. 2. Активация метаболических процессов у зародышей травяной лягушки. ▲ – разброс интенсивности СР-реакций (по данным автора); ■ – рост интенсивности СР-реакций (по данным автора); ● – синтез РНК в ядрах клеток эмбриона.

лась стадия формирования осевого зачатка у амфибий (нейрула). Гастрюляция и нейруляция являются ключевыми фазами развития для формирования осевого зачатка и всей нервной системы хордовых животных. Предпосылки морфогенетических процессов, происходящих при нейруляции, закладываются ранее с началом транскрипционной функции собственного генома зародыша (стадия средней бластулы) и приобретения подвижности клетками презумптивной мезодермы. Также перед гастрюляцией иницируется экспрессия основных генов, определяющих функцию индукционных центров Ньюкупа и Шпеманна и весь ход гастрюляционного процесса. Когда инволюция хордомезодермального материала завершена, наступают заметные извне морфологические изменения, связанные с формированием нервной пластинки и затем замыканием ее в нервную трубку. В процессе нейруляции у амфибий контактирующие хордомезодерма и нейроэктодерма демонстрируют высокий уровень свободнорадикальных реакций (в 1.5–2 раза выше, чем в энтодерме и туловищной эктодерме). В это время зародыш чрезвычайно чувствителен к внешним воздействиям, и поражение его быстро визуализируется благодаря аномальному развитию осевого зачатка: формирующейся нервной пластинки и хорды, изменению всей формы тела.

Благодаря тому, что гибель зародышей наступает не сразу, стадия нейруляции удобна для тестирования различных внешних воздействий. На стадии ранней и средней нейрулы мы тестировали действие надфоновых доз химического агента – сульфата меди, а также радиационного агента – препарата радионуклида Со<sup>60</sup>. Сульфат меди в природных водоемах и почве содержится в низких концентрациях порядка 2.9 РРМ. В морских водах

ТИПИЧНЫЕ АНОМАЛИИ РАЗВИТИЯ АМФИБИЙ,  
ВЫЗВАННЫЕ ТОКСИЧНОЙ СРЕДОЙ,  
ПРИВОДЯЩИЕ К ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ГИБЕЛИ

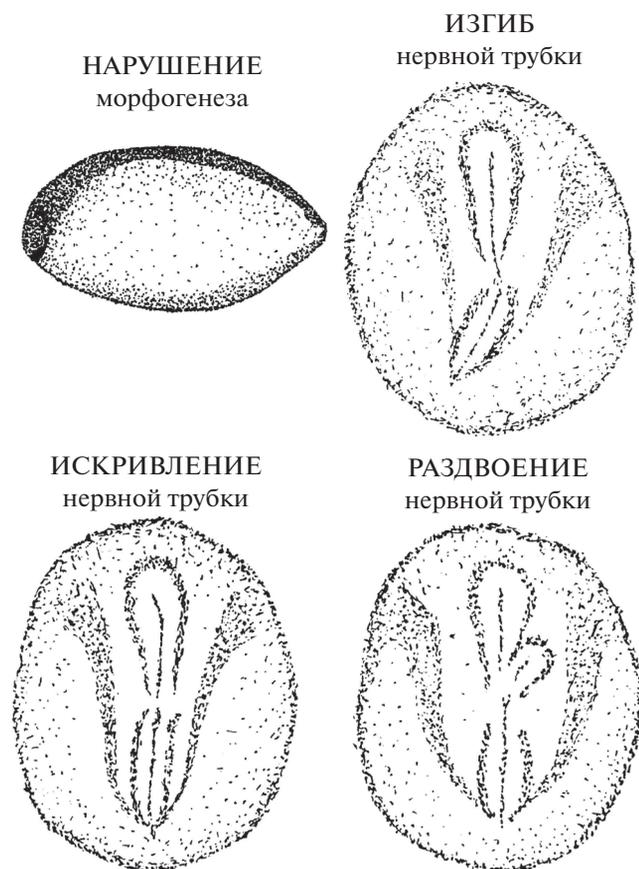


Рис. 3. Типичные аномалии развития амфибий, вызванные токсичной средой, приводящие к эмбриональной гибели.

фоновые значения ионов меди 0.002 PPM, в Белом море – 0.007 мг/л. Исследовали влияние инкубации в растворе сульфата меди с надфоновыми концентрациями  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  мг/л. Обнаружили, что в течение 90 мин пребывания зародышей в опытных растворах уровень СР-реакций значительно повышается, а в течение 3 сут последующей инкубации наблюдается значительное количество аномалий развития осевого зачатка (отсутствие дифференциации отделов тела) (Падалка 2006; Мелехова, 2009).

Воздействовали в течение 14 ч на нейрулы *Xenopus laevis*  $\gamma$ -излучением препаратов  $Co^{60}$  с различной мощностью дозы, в суммарных дозах  $2.5^* - 3.2^* \times 10^{-6}$  Гр. Показан достоверный сдвиг уровня СР-реакций в первые часы после воздействия и значительный морфологический эффект на вторые сутки после облучения: искривление осевого зачатка (57%) и отсутствие дифференцировки тела на отделы (21%) (рис. 3) (Мелехова и др., 2012).

При более длительном воздействии как ионов меди, так и изотопов  $Co$ , зародыши сильно отстают в развитии от контрольной группы и не доживают до метаморфоза. Воздействовали рентгеновским облучением на установке РУМ-17 в дозах от 1 до 300 р при мощности 1 р/мин в двух сериях опытов (Мелехова и др., 2012). Дозы варьировали, меняя время облучения и фокусное расстояние. Получены бимодальные зависимости доза–эффект (по сдвигу уровня СР после облучения). Достоверное повышение уровня СР после облучения отмечено при воздействии доз 4–6 р. Отсроченный эффект – угнетение СР-реакций (через 7–8 ч после облучения), что свидетельствует об изменении физико-химического состояния мембранного комплекса клетки и угнетении ферментативных окислительно-восстановительных процессов. Основные морфологические нарушения на вторые сутки после облучения – резкие искривления нервной трубки и хорды (98%). Гибель облученных в дозе 100 р и выше зародышей отмечена через несколько дней.

Рентгеновское облучение зародышей амфибий в дозе 300 р и 30 р на стадии поздней нейрулы и вылупления из оболочки (закладка глазного зачатка). Относительную концентрацию СР регистрировали через 6 ч после облучения методами привитой сополимеризации и радиоавтографии на гистологических срезах. Морфологические последствия прослеживали по процессам развития глаза личинки на гистологических срезах: исследовали дифференцировку клеточных структур сетчатки, процент делящихся клеток и пикнотических ядер (гибнущих клеток). Обнаружили, что при облучении в дозе 300 р поздней нейрулы происходит нарушение морфогенеза и дифференцировки мозга у личинок, и в ряде случаев – недоразвитие глазного зачатка. При облучении в дозе 30 р при исследовании отдаленного эффекта на стадии вылупления из оболочек отмечено, что в наибольшей степени поражаются и гибнут клеточные элементы, вступающие в дифференцировку (центральная часть сетчатки). Дозовая зависимость процента пикнозов через 6 часов после облучения почти линейная: немедленная гибель клеток снижается после облучения в дозах от 1500 р, до 30 р. Впоследствии в интервале малых доз (30 р) поражение клеточных элементов, вступающих в дифференцировку (в центральной зоне сетчатки), выше, чем в интервале средних–высоких доз. После облучения в дозе 30 р в ранние сроки (6 часов) в этих клетках наблюдается значительный сдвиг уровня СР и наибольший процент клеточной гибели, а в последующие сроки – наиболее заметные задержки и аномалии дифференцировки. Временная зависимость клеточной гибели в этой зоне сетчатки показывает рост количества пикнозов после облучения в дозе 30 р через 48 ч после облучения, что характерно для развития процес-

сов поражения клеток по мембранному механизму (Мелехова, 2010).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Метод ПС выбран, так как свободные радикалы являются чувствительным бимодальным показателем окислительно-восстановительного гомеостаза клетки. Величина, показывающая общий уровень СР, определяет сдвиг равновесия в системе прооксидантов и антиоксидантов. Метаболические свободные радикалы образуются в процессах ферментативного и неферментативного окисления главным образом в мембранах митохондрий, микросом и ядер в клетке. Любые физические и химические воздействия влияют на скорость радикалообразования. Повышение уровня радикалообразования приводит к неспецифическому накоплению липоперекисей, других токсичных продуктов, а также вторичных радикалов, в том числе в биополимерах. В результате развивается общая неспецифическая реакция на повреждение, так называемый окислительный стресс (начальная клеточная фаза многих патологий) (Бурлакова и др., 2001; Кудряшов, 2004). Адаптивной реакцией клетки является активация антиоксидантной защиты. Сдвиг уровня свободных радикалов является диагностическим показателем развития реакции клетки в сторону адаптации или в сторону апоптоза.

С применением предложенной тест-системы показано, что малые и сверхмалые дозы радиационных и химических воздействий на эмбрионы вызывают значительные изменения уровня свободнорадикальных реакций в ранние сроки (3–4 ч) и аномалии развития и гибель эмбрионов в течение 3–4 сут, т.е. дозы, считающиеся допустимыми для взрослых животных, оказываются критическими для выживания эмбрионов. Возможный механизм действия малых и сверхмалых доз физических и химических факторов на клеточном уровне описывается как последовательность событий неспецифического окислительного стресса. На мембране амплифицируется сигнал – каскад свободнорадикальных реакций, инициируемый сигнальными АФК (супероксидом, оксидом азота). Это ведет к развитию цепных СР-реакций, инициации перекисного окисления мембранных липидов; при этом изменяется микровязкость мембраны, а также функциональное состояние мембраносвязанных белков. Ответной адаптивной реакцией является активация системы ферментной и неферментной антиоксидантной защиты, изменение фосфолипидного состава мембран за счет замены легко окисляемых ненасыщенных жирных кислот насыщенными.

Предполагается, что диапазон малых доз включает витальные дозы ниже ПДК и верхняя его граница ниже в 10–100 раз LD50. Диапазон сверхмалых доз, по определению Е.Б. Бурлако-

вой, определяется там, где дозовая зависимость биологического эффекта имеет бимодальный характер, причем биологический эффект может быть отсрочен (Бурлакова и др., 2003). В ряде опытов мы определяли чувствительность эмбриональных клеток к химическим и радиационным воздействиям, немного превышающим фоновые значения. Всякий раз мы получали достаточно заметный отклик как по первичному эффекту (развитие СР-реакций), так и по отсроченному биологическому эффекту (задержка или аномалии развития). Видимо, такая высокая чувствительность к изменениям фона в эмбриогенезе связана с тем, что эмбриональные стадии развития любых животных являются ареной действия естественного отбора. По мнению многих исследователей, радиоактивный фон является необходимой причиной мутаций, некоторые из которых могут оказать преадаптацию (потенциально полезными) и поддерживают необходимый для пластичности вида уровень изменчивости в популяции. А.М. Кузин (Кузин, 2002) высказывал предположение, что радиоактивный фон играет также роль индуктора вторичного биогенного излучения. Вторичные биогенные излучения являются очень важным фактором жизни клетки. Излучения в ультрафиолетовом диапазоне, открытые А. Гурвичем, а также Поппом и другими исследователями, определены как митогенетические лучи. Вместе с тем интенсивность свободнорадикальных реакций в естественном метаболизме отражается в явлении хемилюминесценции (сверхслабого свечения в желто-зеленой области спектра), которое является результатом рекомбинации свободных радикалов (Козлов, 1973). Отметим, что при регистрации сверхслабого излучения эмбрионов шпорцевой лягушки на ранних стадиях развития отмечено появление характерного излучения на стадии средней бластулы, что косвенно подтверждает наши данные о высокой активности радикалообразования в это время (Володяев, 2007). Полученные нами дозовые зависимости уровня свободных радикалов, как при действии рентгеновского облучения, так и при действии химических факторов показывают бимодальную зависимость на уровне слабых доз (Падалка, 2006; Мелехова и др., 2012). При этом на примере действия радионуклида Со60 на критическую стадию развития (ранняя нейрула) показано, что деление клеток и рост эмбриона происходит, но нарушаются процессы морфогенеза и дифференцировки, что и приводит в конце концов к эмбриональной гибели.

На более поздних стадиях, связанных с морфогенезом осевого зачатка, появляются типичные аномалии (искривления, раздвоения и прочие аномалии нервной трубки). При этом надо отметить фазовое развитие уровня свободнорадикальных реакций после облучения и также после химических воздействий. В первые часы после воздействия развиваются реакции перекисного окисления

липидов, а также, по-видимому, образование вторичных радикалов. В результате этих процессов нарушается нормальное функционирование клетки и, во второй фазе, отсроченный эффект носит противоположный знак: снижение уровня СР-реакций, связанное с деструкцией статур клетки.

Мы обнаружили, что самый ранний этап экспрессии собственного генома зародыша по времени и по месту связан с тем зачатком (районом), где в самом начале развития наблюдалась значительная флуктуация уровня СР-реакций в цитоплазме, затем в том же районе происходил весьма значительный рост СР-процессов в ядрах и наконец после этого определялось начало ядерного синтеза РНК, который и знаменует начало активности собственного генома зародыша. Мы это связываем с тем фактом, что значительная часть обнаруживаемых нами методом привитой сополимеризации СР происходит в фосфолипидах, причем большей частью в фосфоинозитах. Фосфоинозитидные системы трансмиттеров внутриклеточных сигналов имеются как на мембране клетки, так и на мембране ядра. Первый “дыхательный взрыв”, как показано многими исследователями, происходит при оплодотворении, так как сперматозоид является хаотропным агентом, нарушающим целостность мембраны и индуцирующим свободно-радикальные цепные реакции. Затем, по нашим данным, СР-реакции развиваются в цитоплазме и в ядерной мембране, что служит передачей сигнала к удлинению клеточного цикла и началу транскрипции (Мелехова, 2010). Соответственно эта стадия развития является весьма чувствительной к повреждению. Даже слабые дозы повреждающих воздействий на этой стадии приводят к гибели эмбрионов.

Необходимо упомянуть о важности участия СР-реакций в биохимическом фоне радиочувствительности. Недавно была опубликована модель “радикальной пары” на примере криптохрома (рецептора магнитного поля у птиц). Для того чтобы произошел акт рецепции магнитного поля, криптохром должен быть активирован супероксидом, и это запускает цепные процессы перекисного окисления. Предполагается, что эта модель работает в случае нетепловых эффектов слабых полей любой природы, т.к. речь идет о восприятии квантов более слабых, нежели энергия химических связей. Авторы модели предполагают, что этот механизм может участвовать в тех химических реакциях, которые зависят от спинового состояния реагентов (авторы — Соловьев и Шультен, 2009).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основой клеточной чувствительности к средовым воздействиям является повышенная генерация электронно-возбужденных и свободнорадикальных состояний, которая входит как интегриру-

ющая часть в общую гомеостатическую систему. В раннем развитии клеточные клоны проходят закономерный путь развития от эмбрионального состояния к дифференцированному, в котором ключевым управляющим моментом переключения метаболизма является повышение чувствительности клеток к экзогенным воздействиям как из внутриорганизменной, так и из внешней среды. Конституциональное повышение уровня радикалообразования составляет эндогенный фон локальной высокой чувствительности детерминирующихся клеток в зачатках эмбриона. Повышенный уровень радикалообразования эпигенетически наследуется в дочерних клетках и приводит к повышению уровня СР и вторичных повреждений ДНК. Кроме того дочерние клетки также будут обладать повышенной чувствительностью к повреждению. Предполагают, что продукты СР-реакций перекисного окисления липидов и другие токсичные соединения атакуют преимущественно липидные линкеры ДНК-мембранного комплекса. При этом нарушается общая система регуляции гомеостаза в клетках.

Ранее нами показано, что высокий уровень свободнорадикальных реакций в норме на ключевых (критических) стадиях развития — это естественный эпигенетический процесс, инициирующий экспрессию генов, необходимую для дифференцировки. Однако такое состояние конституционального “окислительного стресса” определяет и повышенную чувствительность к повреждающим внешним воздействиям. В нормальном развитии эти критические стадии инициации дифференцировки проходят быстро, и если уровень СР резко дополнительно повышается в результате внешнего воздействия, нарушается и последующий энергозависимый процесс — морфогенез и дифференцировка. В результате слабые повреждающие воздействия на ранние стадии развития гидробионтов приводят к гибели эмбрионов.

Реакции эмбриональных объектов на малые дозы химических и радиационных воздействий развиваются по мембранному механизму. Первичным ответом является развитие цепных СР-реакций, перекисное окисление липидов, образование токсичных продуктов. Характерный клеточный ответ — нарушение восприятия информационных межклеточных сигналов, инициирующих экспрессию генов, цитодифференцировку и морфогенез. Клеточные популяции в течение долгого срока сохраняют метаболические аномалии. Дочерние клетки в растущей популяции эпигенетически наследуют повышенный уровень СР-окисления и токсичные продукты перекисного окисления липидов, которые могут атаковать ДНК или нарушать процессы транскрипции через измененное состояние хроматина. Отсроченный эффект — тератогенез (характерные стадийспецифичные уродства) и гибель эмбрионов. Экологическими последствиями являются: рост показате-

лей изменчивости в популяциях, повышенная чувствительность к изменениям факторов среды, сохраняющаяся в потомстве; снижение численности популяций гидробионтов и нарушение экологического равновесия.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бурлакова Е.Б., Михайлов В.Ф., Мазурик В.К. Система окислительно-восстановительного гомеостаза при радиационно-индуцируемой нестабильности генома // Радиационная биология. Радиоэкология. 2001. Т. 41. № 5. С. 489–499.
- Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Мальцева Е.Л. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов // Химическая физика. 2003. Т. 22. № 2.
- Володяев И.В., Белоусов Л.В. Сверхслабые излучения развивающихся яйцеклеток и зародышей шпорцевой лягушки // Онтогенез. 2007. Т. 38. № 5. С. 386–393.
- Гилберт Скотт Ф. Биология развития // Пер. с англ.: Scott F. Gilbert. *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Inc., Publishers; Sunderland Massachusetts, 2003 / СПб: “Информ-Планета”, 2010. 850 с.
- Козлов Ю.П. Свободные радикалы и их роль в нормальных и патологических процессах. М.: Изд-во МГУ, 1973.
- Кудряшов Ю.Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения). М.: Физматлит, 2004. 442 с.
- Кузин А.М. Роль природного РА-фона и вторичного биогенного излучения в явлении жизни. М.: Наука, 2002. 80 с.
- Мелехова О.П. Свободнорадикальные процессы в эмбриогенезе // Онтогенез. 1976. Т. 7. № 2. С. 131–140.
- Мелехова О.П., Коссова Г.В. Способ определения эмбриотоксичности химических соединений и их комплексов // Патент на изобретение № 2073868 от 20.02.1997. 3 с.
- Мелехова О.П. Способ биодетекции воздействия интегрального поля ладоней человека на эмбрионы *Xenopus laevis* или морского гидроидного полипа *Obelia* // Патент на изобретение № 2360645 от 10.07.2009. 12 с.
- Мелехова О.П. Свободнорадикальные процессы в эпигенетической регуляции развития. М.: Наука, 2010. 324 с.
- Мелехова О.П., Коссова Г.В., Падалка С.М. и др. Биотехнология экспрессной детекции биологического эффекта слабых электромагнитных воздействий // “Труды XX Международной конференции и дискуссионного научного клуба “Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии”. Ялта–Гурзуф, 05–15 июня 2012 г. С. 235–236.
- Мелехова О.П. Процессы самоорганизации в критических точках эмбриогенеза. Экологические последствия // “Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция”. Тезисы докладов Всероссийской конференции с международным участием. СПб. 2013. С. 51–53.
- Мелехова О.П. О механизмах воздействия малых доз ионизирующего излучения на развивающиеся организмы // “Человек и электромагнитные поля”. Тезисы докладов V Международной конференции (г. Саров, 23–27 мая 2016 г.). Саров, 2016. С. 82–83.
- Падалка С.М. Влияние слабых электромагнитных и химических воздействий на эмбриональное развитие амфибий. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2006.
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function // *Physiol. Rev.* 2002. № 82. P. 47–95.
- Melekhova O., Limarenko I., Kossova G. et al. Disclosure of subsmall radiation doses through radical copolymerization in embryo biotests // *Intern. Conf. Bioscience-try*. Moscow-Obninsk. 1998.
- Solov'yov I., Schulten K. Magnetoreception through cryptochrome may involve superoxide // *Biophysical Journal*. 2009. V. 96. № 12. P. 4804–4812.

## Use of Fundamental Properties of Embryonic Objects for Studying Potential Environmental Effects of Technogenic Impacts

O. P. Melekhova

*Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

*e-mail: muffs2013@gmail.com, muffs2003@gmail.com*

Received August 29, 2016

This article analyzes the problems of biosafety in terms of individual development patterns. Previously, the key role of epigenetic free radical processes in normal embryonic development of lower vertebrates in the formation of the competence and determination of embryonic primordia has been demonstrated, and a significant increase in the intensity of free radical process before every qualitative change in homeostatic mechanisms in developing organisms was found: in induction systems, before hatching of the embryo from the shells, and in preparation for metamorphosis. Thus, the activation of free radical processes in embryonic primordia corresponds to instability and characterizes the “critical periods of development” and increased sensitivity of the embryo to environmental impacts. Patented methods and a test system that allows detecting early biological effects of weak environmental impacts and predicting their environmental risk are presented. Possible mechanisms of significant biological effects of weak radiation and chemical impacts on the developing organism are discussed. The necessity of including embryonic objects in the protocol of testing the biosafety of technological developments is substantiated.

*Keywords:* lower vertebrates, embryos, larvae, free radicals, biosafety, weak effects, test system