

УДК 570.4:576.312

М.Р. Верголяс, В.В. Гончарук

**ВЛИЯНИЕ ИЗОТОПНОГО СОСТАВА ВОДЫ
НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОРГАНИЗМЫ
ЦИТОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ**

Институт коллоидной химии и химии воды
им. А.В. Думанского НАН Украины, г. Киев
vergolyas@meta.ua

Проведен цитологический анализ кондиционированных вод с измененным изотопным составом. Впервые описывается влияние легкой и тяжелой вод на организм и клетки рыб. Показано негативное влияние тяжелой воды в отличие от легкой, которая имеет положительный фактор.

Ключевые слова: генотоксичность, двойные ядра, легкая вода, микроядра, тяжелая вода, формула крови рыб, цитотоксичность.

Введение. В настоящее время проводятся все больше исследований, посвященных изучению влияния воды с пониженной и повышенной концентрацией дейтерия на биологические объекты и функции организма, позволяющие использовать ее в практических целях. Но вопрос о механизме действия легкой и тяжелой вод на клеточном уровне остается недостаточно изученным.

Биологические системы являются очень чувствительными к изотопным эффектам. Так, при изменении изотопического состава химических соединений происходят изменения параметров биохимических реакций.

Обменные процессы жизнедеятельности живых организмов протекают более интенсивно, если химические соединения обогащены легкими изотопами [1]. Наиболее сильно этот эффект может проявиться в водных объектах, так как в них относительная разница массы изотопов водорода максимальна и вода является тем основным веществом, которое определяет все процессы жизнедеятельности в организмах.

© М.Р. Верголяс, В.В. Гончарук, 2015

Изотопический сдвиг воды (как легкой, так и тяжелой) может активизировать или угнетать биохимические процессы в организме.

Во всех живых организмах происходят биохимические реакции, а легкая вода повышает скорость последних по сравнению с водой природного изотопного состава. Этот эффект известен под названием "кинетический изотопный эффект растворителя" [2].

Наиболее сильное влияние очистка воды от молекул тяжелой воды оказывает на "энергетический аппарат" живой клетки. Дыхательную цепь митохондрий отличают каскадные реакции. Тяжелая вода замедляет скорость реакций дыхательной цепи. Снижение содержания тяжелых изотопов в воде до уровня ниже природных концентраций деингибирует и достоверно ускоряет реакции клеточного дыхания [3].

Под влиянием легкой воды деингибируется инициированный глюкозой выход инсулина из ткани поджелудочной железы и островков Лангерганса и увеличивается поглощение глюкозы клетками. Легкая вода повышает скорость метаболических реакций, например при старении, метаболическом синдроме, диабете и др. [4].

С возрастом у людей метаболические реакции в организме все же замедляются. Наряду с традиционным лечением больных с сахарным диабетом или для профилактики вполне приемлемо назначение воды с пониженным содержанием дейтерия.

О противоопухолевой активности легкой воды свидетельствуют клинические испытания, проведенные Г. Шомлаи в 1994 – 2001 г.г. в Венгрии. Эти испытания показали, что уровень выживаемости больных, употреблявших легкую воду в сочетании с традиционными методами лечения или после них, значительно выше, чем у больных, применявших только химио- или лучевую терапию. Также противоопухолевая активность легкой воды объясняется стимуляцией генерации пероксида водорода в митохондриях [4].

Существенным обстоятельством является то, что стандартами на питьевые воды не регламентируется изотопный состав воды. Очевидной причиной этого служит малая информированность о биологических воздействиях на животные и растительные организмы вод с измененным изотопным составом, недостаточность и незавершенность их исследований.

Цель данной работы – изучение принципа действия воды с измененным изотопным составом и определение ее влияния на клетки тест-организма (рыбы *Danio rerio*).

Рыбы реагируют на токсиканты подобно высшим позвоночным, например млекопитающим, поэтому они могут быть использованы для обнаружения веществ, которые вызывают канцерогенный эффект у человека [5], в данном случае для изучения действия тяжелой воды.

Непосредственно для живущих в воде организмов цикл жизни и химические реакции в них происходят так же, как у других позвоночных, к которым рыба близка по своим органам и системам (лягушки, крысы, кролики, птицы) [6]. Поэтому они могут стать "контролем" и при изучении влияния легкой воды, повышающей скорость метаболических реакций.

Анализ микроядер – как метод исследования генотоксичности и биомаркер генотоксического риска для человека – является уникальным способом оценки. В последнее время он приобретает все большую популярность. По сравнению с тестом на хромосомные аберрации подсчет микроядер является более простым, не требует долгой подготовки и занимает меньше времени, т.е. микроядерный тест в силу своей простоты и возможностей быстрого анализа становится методом скрининга химических соединений на генотоксичность. Еще одним преимуществом этого метода является то, что он позволяет проводить оценку уровня хромосомных нарушений по анализу интерфазного ядра, т.е. не требует наличия клеток в митозе, в отличие от теста на индукцию хромосомных аберраций [7, 8].

Для оценки цитотоксичности водных образцов исследуют влияние токсических веществ на тест-организм (рыбу), а именно на клетки крови лейкоцитов. При определении цитотоксичности водной среды в качестве биомаркера используют форменные элементы крови рыб, определяют количество этих элементов (лейкоцитов) и по их соотношению в контрольном и опытном образцах оценивают цитотоксичность водной среды [9,10].

Таким образом, исследование цитоморфологических параметров клеток крови и других тканей (жабры и хвостовой плавник) позволит получить информацию о состоянии иммунитета особи, уровня влияния на нее стрессовых факторов и стабильности генома (по частоте микроядер и ядерных аномалий в эритроцитах), что в совокупности с другими параметрами, получаемыми при популяционных исследованиях (генотип, морфологии), может дать сведения, чрезвычайно полезные в практическом и теоретическом отношении.

Методика эксперимента. В работе использовали кондиционированные воды с измененным изотопным составом – легкая протиевая вода (37,5 ppm дейтерия) и тяжелая дейтериевая вода (99,9 % дейтерия). Контрольная вода была приготовлена в лабораторных условиях согласно рекомендациям ДСТУ 4174:2003.

У исследуемых рыб отбирали кровь из хвостовой вены, образцы плавника и жаберной ткани, а затем готовили цитологические препараты. С отобранной крови делали мазки, фиксировали 96 %-ным раствором этилового спирта, высушивали и окрашивали (25 мин) раствором азур-эозина по Романовскому-Гимза [11]. Кусочки плавника и жаберной ткани фиксировали смесью глицерина, уксусной кислоты и дистиллированной воды при объемном соотношении соответственно 1:1:10. Полученные отпечатки тканей также окрашивали по Романовскому-Гимза в течение 45 мин. Цитологические препараты исследовали под световым микроскопом (общее увеличение $\times 1000$), и определяли количество клеток с микроядрами и двойными ядрами в контрольной и исследуемых группах. Затем проводили сравнительный анализ количества образованных микроядер и двойных ядер. Количество клеток, проанализированных для каждой рыбы, составляло 3000.

Статистическую обработку проводили стандартными методами; токсический эффект считается действительным при статистически достоверной разницы с контролем [12]. Для определения формулы крови в различных участках мазка подсчитывали 250 клеток, идентифицируя их по классификации, предложенной [13], а затем вычисляли процент каждого типа клеток. Также определяли цитотоксичность и специфичность формулы крови у рыб как биомаркер [9].

При исследовании воды с измененным изотопным составом применяли по два образца кондиционированной легкой протиевой воды (37,5 ppm дейтерия) и тяжелой дейтериевой воды (99,9% дейтерия). Для каждого образца использовали по 10 особей рыбы *Danio rerio* и проводили экспозицию.

Результаты и их обсуждение. Проведено биотестирование и цитологический анализ исследуемых проб воды (табл. 1 – 3).

Таблица 1. Тест-организмы *Danio rerio* (L.) после экспозиции (72 – 96 ч) в исследуемых образцах вод с измененным изотопным составом

Особи, %	Вода				
	контроль (1)	легкая (2)	тяжелая (3) – 96 ч	тяжелая (4) – 72 ч	легкая (5)
Погибшие	0	0	100	70	0
Выжившие	100	100	0	30	100

Из результатов биотестирования с помощью *Danio rerio* видно, что кондиционированная легкая вода (2) не вызывала острую токсичность, а в кондиционированной тяжелой дейтериевой воде (3) на четвертые сутки эксперимента наблюдалась 100 %-ная гибель организмов.

Для дальнейшего исследования принципа действия воды с измененным изотопным составом на клеточном уровне выжившие особи в кондиционированной тяжелой дейтериевой воде (4) на третьи сутки были перемещены в емкость с легкой водой на 96 ч. После окончания инкубации у всех рыб отбирали образцы тканей (кровь, жабры, хвостовой плавник), готовили препараты и проводили цитологические исследования, как описано выше.

Таблица 2. Изменение состава форменных элементов крови *Danio rerio* (L.) после экспозиции (72 – 96 ч) в водах с измененным изотопным составом

Вода	Лимфоциты		Моноциты		Сегментоядерные нейтрофилы		Палочкоядерные нейтрофилы		Базофилы		Эозинофилы		Σ клеток
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Контроль (1)	221	88,4	9	3,6	12	4,8	4	1,6	3	1,2	1	0,4	250
Легкая (2)	215	86	11	4,4	15	6	4	1,6	2	0,8	3	1,2	250
Тяжелая (3) – 96 ч	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
То же (4) – 72 ч	164	65,6	28	11,2	16	6,4	9	3,6	18	7,2	15	6	250
Легкая (5)	202	80,8	18	7,2	12	4,8	6	2,4	7	2,8	5	2	250

По показателям форменных элементов периферической крови рыб *Danio rerio*, в легкой воде (2) цитотоксический эффект не наблюдался. В тяжелой воде (4) уменьшилась количественная доля лимфоцитов до 65,6 %. Это произошло за счет увеличения количества моноцитов, базофилов, эозинофилов и нейтрофилов. Такое соотношение различных лейкоцитов в крови свидетельствуют о том, что тяжелая вода вызвала воспалительный процесс в организме. Показатели форменных элементов крови в легкой воде (5) после воздействия тяжелой (4) приближались к таковым контрольной воды.

Таблица 3. Генотоксическое влияние вод с измененным изотопным составом на клетки *Danio rerio* (L.) после экспозиции (72 – 96 ч)

Тип клеток	Показатели, %	Вода				
		контроль (1)	легкая (2)	тяжелая (3) – 96 ч	тяжелая (4) – 72 ч	легкая (5)
Эритроциты	мЯ	0	0	–	0,99	0,33
	2N	0	0	–	0,99	0,33
Клетки жабр	мЯ	0	0	–	0,67	0,33
	2N	0	0	–	0,99	0,66
Клетки хвостового плавника	мЯ	0	0	–	0,67	0,33
	2N	0	0	–	0,67	0,33

Примечание. мЯ – микроядро, 2N – двойное ядро.

Результаты исследования показали, что кондиционированная легкая вода (5) является сильнейшим биологическим стимулятором, так как образовавшиеся аномальные ядра (мЯ – микроядро, 2N – двойное ядро) под воздействием тяжелой воды уже на четвертые сутки начали восстанавливаться.

Увеличение соотношения дейтерий/протий приводит к повышению вероятности заболевания раком, поскольку дейтерий способствует быстрому размножению раковых клеток [14].

Литературные данные [15] и наши исследования свидетельствуют, что тяжелая вода обладает сильнейшим генотоксическим эффектом, ярко выраженным уже на третьи сутки, а на четвертые – наступает гибель тест-организмов. Изотопные эффекты, появляющиеся при увеличении в воде количества тяжелых водородных ато-

мов, негативны для живых систем. Накопление дейтерия в клетках ведет к замедлению нервных процессов и скорости протекания важнейших энзимных реакций. Нарушение и/или замедление биохимических реакций в клетках организма приводит к новообразованиям, онкологическим заболеваниям органов и тканей.

Выводы. Показано негативное влияние тяжелой воды на организм и клетки рыб. При увеличении количества атомов протия легкая вода действует как положительный фактор. Вода с низким содержанием дейтерия обладает большей биологической активностью; в лейкоцитарной формуле крови она повышает количество лимфоцитов за счет уменьшения количества лейкоцитов – снимает воспалительный процесс в организме, способствует быстрому выведению токсикантов (дейтерия) из организма. Легкая вода ускоряет и нормализует обменные процессы в клетках, при этом наблюдается восстановление обнаруженных аномалий ядер в тканях рыб.

Таким образом, легкая вода активизирует биологические реакции в живых системах. Поэтому очевидна необходимость, в зависимости от целей, регулирования изотопного состава воды для ее употребления.

Резюме. Проведено аналіз кондиційованих вод із зміненням ізотопним складом. У роботі вперше описується вплив легкої та важкої води на організм і клітини рыб. Показано негативний вплив важкої води на організм, а легка вода діє як позитивний фактор.

M.R. Vergolyas, V.V. Goncharuk

INVESTIGATION OF ISOTOPIC COMPOSITION OF WATER ON BIOLOGICAL ORGANISMS CYTOLOGICAL METHODS

Summary

Analysis of conditioned water with altered isotopic composition was conducted. The work for the first time describes the effect of light and heavy water on the organism and the cells of fish. As a result, negative influence of heavy water on the organism was shown and the light water acts as a positive factor.

Список использованной литературы

- [1] *Бадьин В. И., Дробышевский Ю. В.* // Изв. Акад. пром. экологии. – 2004. – **8**. – С. 54–58.
- [2] *Райхардт К.* Растворители и эффекты среды в органической химии. – М.: Мир, 1991. – 763 с.
- [3] *Pomytkin I.A., Kolesova O.E.* // *Bul. Experim. Biol. and Med.* – 2006. – **142**, N5. – P. 233–245.
- [4] *Sinyak Y., Grigoriev A., Gaydadimov V., Gurieva T., Levinskih M., Pokrovskii B.* // *Acta Astronautica.* – 2003. – **52**. – P. 52–57.
- [5] *Al-Sabti K.* // *Mutation Res.* –1995. – **23**. – P. 121–135.
- [6] *Верголяс М.Р., Гончарук В.В.* // Фактори експериментальної еволюції організмів. Присвячено: 90-річчю від часу заснування Української Академії наук / Зб. наук. праць. – 2008. – Т.4. – С. 60–63.
- [7] *Norppa H., Falck G.C.* // *Mutagenesis.* – 2003. – **18**, N 3. – P. 221–233.
- [8] *Arkhipchuk V.V., Garanko N.N.* // *Ecotoxicol. and Environ. Safety.* – 2005. – **112**. – P. 215–221.
- [9] *Пат. 93964 Україна, МПК G 01N 33/18 / В.В. Гончарук, М.Р. Верголяс.* – Опубл. 25.03.2011, Бюл. №6.
- [10] *Верголяс М.Р., Безруков В.Ф., Манило Л.Г.* // Матеріали Міжнар. конф. "Сучасні проблеми біології, екології та хімії" (Запоріжжя, 2007). – Запоріжжя, 2007. – Ч.1 – С. 217–220.
- [11] *Giemsa G.* // *Zentralblatt fur Bakteriologie.* – 1904. – **37**. – P. 308–311.
- [12] *Лакін Г. Ф.* Биометрия. – М.: Высш. шк., 1980. – 293 с.
- [13] *Иванова Н.Т.* Атлас клеток крови рыб. – М.: Легкая и пищ. пром-сть. – 1983. – 184 с.
- [14] *Bild W.* // *Rom. J. Physiol.* – 1999. – **36**. – P. 205–218.
- [15] *Лобышев В.Н., Калининко Л.П.* Изотопные эффекты D₂O в биологических системах. – М.: Наука, 1978. – 215 с.

Поступила в редакцию 08.04.2014 г.