

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ДЕЙТЕРИЯ ВОДЫ НА ЖИВЫЕ СИСТЕМЫ

Джимак С.С., Козин С.В.

Кубанский государственный университет
ул. Ставропольская, 149, г. Краснодар, 350040, РФ
e-mail: jimack@mail.ru

Аннотация. Изучено влияние воды с пониженным по отношению к природному содержанию дейтерия на организм различных поколений лабораторных крыс в физиологических условиях, в ходе которых установлено, что наиболее существенное и быстрое снижение равновесия D/H наблюдалось в плазме крови, на 36,2%, а также в лиофилизированных тканях почки (на 15,8%). Менее выраженное уменьшение дейтерия характерно для тканей печени (на 9,3%) и сердца (на 8,5%). Была зафиксирована стабилизация скорости реакций изотопного обмена в крови и тканях изученных органов крыс, начиная со второго поколения. При этом на фоне введения в пищевой рацион воды с содержанием дейтерия 40 ppm также отмечено изменение морфофункциональных показателей у лабораторных животных, связанных с процессами адаптации к субстрессовому воздействию изотопного D/H градиента. В исследовании показано, что модификация только питьевого режима не позволяет существенно изменить содержание дейтерия в тканях метаболически активных органов, в связи с параллельным поступлением дейтерия в составе пищевых веществ растительного и животного происхождения.

Ключевые слова: легкая вода, дейтерий, изотопный состав тканей, дейтерий в плазме крови, ЯМР-спектроскопия, масс-спектроскопия.

INFLUENCE OF LOW WATER DEUTERIUM CONCENTRATIONS ON LIVING SYSTEMS

Dzhimak S.S., Kozin S.V.

Kuban State University
Stavropolskaya St., 149, Krasnodar, 350040, Russia
e-mail: jimack@mail.ru

Abstract. The influence of deuterium depleted water on the body of different rat generations was investigated in physiological conditions. As a result of this study it was established that the most significant and rapid reduction in D/H equilibrium was observed in plasma (by 36.2%), and lyophilized kidney tissues (by 15.8%). Less pronounced deuterium decrease was characteristic of liver tissue (9.3%) and heart (8.5%). Stabilization of the isotopic exchange reaction rate was fixed in the blood and tissues of rats, starting from the second generation. At the same time when deuterium depleted water (40 ppm) was used in dietary intake, the change in morphological and functional parameters in laboratory animals associated with the processes of adaptation to the effects of substress isotopic D/H gradient was also noted. The study shows that modification of only drinking water intake regime can't significantly change the deuterium content in tissues of metabolically active organs, because of the concurrent deuterium receipt in feed substances of plant and animal origin.

Keywords: deuterium depleted water, deuterium, tissue isotopic composition, deuterium in blood plasma, NMR spectroscopy, mass spectroscopy.

В отечественной и зарубежной научной литературе встречается достаточно много работ, изучающих влияние воды со сниженным (относительно природного) содержанием дейтерия или легкой воды (ЛВ) на физиологическую активность живых организмов [1-3]. Среди них можно выделить несколько направлений, посвященных изучению противоопухолевых эффектов; воздействию ЛВ на эндогенную антиоксидантную систему и неспецифическую резистентность организма; изучение биологических эффектов ЛВ на живых объектах различного уровня.

Вместе с тем влияние воды на изотопный состав тканей и морфофункциональные показатели у многоклеточных организмов в различных поколениях исследовано недостаточно, что представляет особый интерес, так как изучение морфофункционального статуса является одним из основных информативных показателей индивидуального развития организма, состояния его здоровья, а введение в пищевой рацион ЛВ может оказывать влияние на показатели системы неспецифической защиты и адаптационные возможности организма, особенно у детенышей в различных поколениях.

В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования было изучение изотопного состава крови и лиофилизированных тканей у крыс различных поколений при введении в их пищевой рацион ЛВ, а также исследование влияния реакций изотопного обмена (D/H) на морфофункциональные показатели организма у лабораторных животных.

Материалы и методы. Работа была выполнена на крысах линии Вистар, по 20 животных в каждой изучаемой группе, которые формировали из расчета 4-6 самцов (30-40%) и 14-16 самок (60-70%). Первое поколение составили крысы в возрасте 4-6 месяцев (масса тела 240 ± 50 г, колебание массы тела по группе ± 10 г), которые были разделены на 2 группы: А₁ (n=20), и Б₁ (n=20) – в зависимости от изотопного состава воды в их пищевом рационе. В группе А животные всех поколений (группы А₁₋₅) на протяжении всего эксперимента получали обычный пищевой рацион и ЛВ (40 ppm, здесь и далее указано содержание по дейтерию). В группе Б животные всех поколений (группы Б₁₋₅) на протяжении всего эксперимента получали обычный пищевой рацион и минерализованную воду 150 ppm. В дальнейшем животные, рожденные в группах А₁ и Б₁ составили второе поколение крыс – группы А₂ (n=20) и Б₂ (n=20) соответственно, потомки которых затем составили группы А₃ и

Б₃ и так далее. В группах А₁ и Б₁ исследование изотопного состава плазмы крови и тканей органов было проведено через 4 недели после начала эксперимента. Во всех группах 2-5 поколений изучение изотопного состава крови и лиофилизированных тканей (печени, почки, сердца) выполнено на 4-6 месяц развития. Кроме того, в группах А₁, А₃ и Б₁, Б₃ было проведено взвешивание животных в течение 3-х недель с целью оценки влияния реакций изотопного обмена (D/H) на прирост массы тела взрослых (группа А₁) после введения в пищевой рацион ЛВ и новорожденных крыс (группа А₃) в первые 3 недели после рождения. При этом родители последних (группа А₂) на протяжении всего онтогенеза также получали воду со сниженным содержанием дейтерия (40 ppm).

Все животные содержались в виварии при сходных условиях в отношении температуры, влажности, освещения, а также получали одинаковый пищевой рацион. Лабораторные крысы находились в виварии при температуре воздуха от +20 до +22 °С, влажности – не более 50%, в световом режиме – день-ночь. Животных размещали в одинаковых пластиковых клетках и содержали на стандартном рационе (крупы, мясо и овощи).

Воду со сниженным содержанием дейтерия получали на установке, разработанной в Кубанском государственном университете. Исходная концентрация дейтерия в получаемой воде составляла 40 ppm. Минерализацию полученной воды, производили путем добавления минеральных солей для получения физиологически полноценного минерального состава (минерализация 314-382 мг/л: гидрокарбонаты 144-180 мг, сульфаты менее 1 мг, хлориды 60-76 мг, кальций: 6 мг, магний: 3 мг, натрий 50-58 мг, калий 50-58 мг), который был идентичен у воды с содержанием дейтерия 40 ppm и 150 ppm.

Кроме того, на протяжении всего эксперимента проводилось наблюдение за физической активностью животных, их аппетитом, характером кала. Также ежедневно производили клинический осмотр, взвешивание животных и учет объема потребления ЛВ (на голову лабораторных крыс). Все исследования проводились примерно в одно и тоже время до кормления животных. Сохранность подопытных животных в контрольной и экспериментальных группах А₁ и Б₁ была полной (100 %) в течение всего эксперимента, а в группах А₂₋₅ и Б₂₋₅ составила 90-95% и 80-95% соответственно.

Определение концентрации дейтерия в полученной воде были проведены на импульсном ЯМР спектрометре JEOL JNM-ECA 400MHz [4].

Для определения изотопного состава лиофилизированных органов лабораторных животных использовался масс-спектрометр DELTA^{plus} (Finnigan, Германия). Колебание дейтерия в крови и лиофилизированных тканях контрольной группы во всех поколениях (Б₁₋₅) не превышало 1 %, что позволило вывести среднюю контрольную величину содержания дейтерия для каждого исследованного органа и плазмы крови.

Для определения изотопного состава продуктов питания каждый органический образец массой от 0,5 до 3 мг был высушен сублимацией.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли методами вариационной статистики с использованием свободного программного обеспечения – системы статистического анализа R (R Development Core Team, 2008, достоверным считали различие при $p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение. По результатам выполненных исследований видно, что при изменении изотопного состава пищевого рациона, в данном случае – воды со сниженным содержанием дейтерия, в организме лабораторных животных также наблюдается уменьшение концентрации данного изотопа. Что касается крыс группы А с 1-го по 5-е поколения, содержание дейтерия в почках и плазме крови примерно одинаково за исключением первого поколения, где концентрация дейтерия несколько повышена относительно последующих поколений животных в группах А₂₋₅ на 13-19% и 4-5% соответственно ($p < 0,05$). Более быстрое, хотя и менее существенное по абсолютным значениям, достижение D/H равновесия в первом поколении наблюдалось в метаболически активных тканях печени и сердца. Динамика снижения концентрации дейтерия в органах разных поколений происходит неодинаково, так, в лиофилизированных тканях почки группы А₅ наблюдается достоверное снижение концентрации дейтерия на 15,8% по сравнению с контрольной группой животных. В то же время в лиофилизированных тканях печени в группе А₅ снижение содержания дейтерия составило 9,3% ($p < 0,05$), а в лиофилизированных тканях сердца 8,5% ($p < 0,05$). При этом наиболее значимое снижение концентрации дейтерия происходило в плазме крови (на 36,2%, $p < 0,05$), что положительно коррелирует с данными D. M. O'Brien с соавторами, которые показали, что при изменении изотопного состава диеты Chironomidae (Diptera), только 30,8 ± 2,6% тяжелой воды могут быть заменены в организме на легкую воду [5].

Столь неравномерное снижение концентрации дейтерия в органах лабораторных животных может быть связано с их различной метаболической активностью, а также особенностями изменения морфофункционального состояния клеточных структур, что отражает процесс адаптации организма в изменившихся условиях жизнедеятельности при формировании изотопного градиента на фоне более быстрого снижения дейтерия в крови. Известно, что наиболее активно реакции изотопного обмена D/H идут в соединениях, имеющих атомы с неподеленной электронной парой и способных образовывать промежуточные реакционные комплексы при участии водородных связей, в котором реализуется синхронный переход протонов (H⁺) и дейтериевых (D⁺) от одной молекулы к другой. Поэтому чаще такой обмен наблюдается в соединениях, имеющих гидроксильные (–OH), реже тиоловые группы (–S–H), первичные и вторичные аминогруппы (–NH₂ и =N–H), а вот в углеводородных связях (R₃C–H(D)) в естественных условиях такой обмен практически невозможен, что отчасти объясняет факт неполного изотопного D/H обмена в биологических объектах, где большинство атомов водорода связано с углеродными атомами. Альтернативный и более быстрый путь обмена дейтерия на протий в тканях и крови включает обмен молекул HDO на H₂O при первичной и вторичной сольватации различных макромолекул.

Колебания изотопного состава тканей могут проводить к увеличению активности неспецифических защитных систем, что объясняется феноменом преадаптации, потенцирующей защитные механизмы в клетках в условиях субстрессового воздействия различных факторов (например, температуры, гипоксии и др.), в том числе по аналогичному механизму может реагировать система неспецифической защиты в условиях созданного D/H градиента, что может быть связано с ответной реакцией клеточных регуляторных систем, учитывая стремление живой материи к постоянству изотопного состава. Приспособительные реакции реализуются преимущественно за счет более активного обмена дейтерия в биологически активных молекулах: в активных центрах ферментов или участках аллостерической регуляции, в транскрипционных факторах, а также в гидратной оболочке белков и нуклеиновых кислот, что может изменять их термодинамические а, следовательно, и термокинетические характеристики, повышая адаптационные возможности организма даже при относительно незначительном (от 10% до 30%) обмене тяжелых изотопов в тканях. Незначительно выраженный и более медленный D/H обмен в органах возможен по причине поступления дополнительных количеств дейтерия в составе нутриентов. В связи с этим проведена оценка содержания дейтерия в продуктах питания опытной и контрольной групп животных (морковь, зерно пшеницы, мясо), показатели которого составили от 137,22 до 142,52 ppm. Более высокое содержание дейтерия выявлено в продуктах растительного происхождения, которое было на 2,4-3,9% больше в сравнении с мясными продуктами. Полученные результаты напрямую коррелируют с данными O'Brien [6], что подтверждает возможность участия дейтерий-содержащих пищевых веществ в пополнении пула тяжелых изотопов водорода, особенно в тканях с высокой скоростью обменных процессов (печени, сердце), куда происходит постоянное поступление новых биосубстратов для пластического и энергетического обмена.

При оценке влияния реакций изотопного обмена на показатели прироста у лабораторных животных было установлено, что введение в пищевой рацион воды 40 ppm приводит к феномену преадаптации в основном в первые 2 недели эксперимента. При этом в первом поколении (группа A₁) в течение недели наблюдалось снижение массы тела в сравнении с начальными показателями на 5,2%. Далее происходило увеличение положительного прироста массы тела, которое возвращалось по динамике к контрольным значениям на 3 недели эксперимента и отражало период адаптации организма к сформированному изотопному D/H градиенту. Однако и после 3-й недели средняя масса тела животных в группе A₁ оставалась сниженной на 7,7% в сравнении с показателями контрольной группы (B₁, p<0,05).

Иная динамика прироста массы тела отмечена в третьем поколении (группа A₃), когда в первую неделю после рождения масса крыс также была меньше в сравнении с контрольной группой на 26,9%. Однако, через 3 недели после рождения было отмечено повышение адаптационных возможностей организма у крыс, получающих ЛВ, что сопровождалось увеличением прироста массы тела, которое даже превышало аналогичные показатели контроля (группа B₃) на 32,1%.

Следует отметить меньшую дисперсию показателей массы тела, а также более высокую выживаемость у крыс в группе A₃ ($\sigma=1,77$ г, $n_{21}=95\%$) в сравнении с группой B₃ ($\sigma=3,20$ г, $n_{21}=90\%$), что указывает на повышение адаптационных возможностей при употреблении ЛВ. Такой факт можно связать с активацией митогенных факторов, приводящей к экспрессии генов ферментов антирадикальной защиты и белков теплового шока, при воздействии изотопного D/H градиента на компоненты системы неспецифической защиты организма, то есть более быстрой и полноценной реализацией механизмов долгосрочной адаптации у животных, чьи родители потребляли ЛВ в период всего онтогенеза. Кроме того, было отмечено более быстрое половое созревание у крыс, получающих воду со сниженным содержанием дейтерия, оно было на 1-1,5 месяца быстрее, чем у животных контрольной группы. При этом первый приплод отличался меньшей численностью и большей гомогенностью показателей массы тела, что, возможно, подтверждает субстрессовое воздействие изотопного D/H градиента на организм самки.

Таким образом, в проведенном исследовании продемонстрирована возможность модификации изотопного состава крови и тканей органов, при введении в пищевой рацион воды со сниженным содержанием дейтерия, а также влияние реакций изотопного обмена на реализацию адаптационных процессов в организме.

Заключение. На основании проведенных исследований установлено, что введение в пищевой рацион легкой воды приводит к формированию изотопного D/H градиента в первые три недели между плазмой крови и тканями органов. Происходит снижение концентрации дейтерия в крови на 36,2% и тканях печени, почки и сердца на 9,3%, 15,8% и 8,5 % соответственно, что сопровождается изменением адаптационных возможностей организма. Показано, что изменение только питьевого режима не позволяет существенно изменить содержание дейтерия в тканях метаболически активных органов, это обусловлено параллельным поступлением дейтерия в составе пищевых веществ растительного и животного происхождения. Стабильное D/H равновесие в плазме крови и тканях печени, почки и сердца наступает у животных во втором поколении и сохраняется на протяжении жизни пяти поколений без достоверных изменений. На фоне изотопного D/H градиента развивается отрицательный прирост массы тела у крыс первого поколения, достигающий максимума к концу первой недели. В дальнейшем на третьей неделе динамика прироста массы тела восстанавливается у крыс первого поколения, но абсолютные значения их морфофункциональных показателей не достигают контрольных значений. Реакции изотопного D/H обмена у крыс третьего поколения приводят к замедлению прироста массы тела на 26,9% на первой неделе после рождения. Однако в последующем на третьей неделе динамика прироста у крыс третьего поколения превосходит показатели контрольной группы на 32,1%, что отражает более быстрое повышение долгосрочных адаптационных возможностей организма при снижении содержания дейтерия на протяжении всего онтогенеза, включая внутриутробный период. Полученные результаты позволяют говорить о способности

воды со сниженным содержанием дейтерия изменять изотопный (D/H) состав крови и тканей и повышать, таким образом, потенциал защитных системы организма при подготовке его к последующему стрессовому воздействию или при возможном развитии альтернативных патологических процессов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых МК-3359.2017.4.

Список литературы / References:

1. Samkov A.A., Dzhimak S.S., Barishev M.G., Volchenko N.N., Khudokormov A.A., Samkova S.M., Karaseva E.V. The effect of water isotopic composition on *Rhodococcus erythropolis* biomass production. *Biophysics.*, 2015, vol. 60, no. 1, pp. 107-112.
2. Chernukha I.M., Fedulova L.V., Kotenkova E.A., Vasilevskaya E.R., Lisitsyn A.B. The effect of water with modified isotope (D/H) composition on the reproductive function and postnatal development in rats. *Voprosy Pitaniia.*, 2016, vol. 85, no. 5, pp. 36-43.
3. Boros L.G., D'Agostino D.P., Katz H.E., Roth J.P., Meuillet E.J., Somlyai G. Submolecular regulation of cell transformation by deuterium depleting water exchange reactions in the tricarboxylic acid substrate cycle. *Medical Hypotheses.*, 2016, vol. 87, pp. 69-74.
4. Dzhimak S.S., Basov A.A., Kopytov G.F., Kashaev D.V., Sokolov M.E., Artsybasheva O.M., Sharapov K.S., Baryshev M.G. Application of NMR spectroscopy to the determination of low concentrations of nonradioactive isotopes in liquid media. *Russian Physics Journal.*, 2015, vol. 58, no. 7, pp. 923-929.
5. Wang Y.V., O'Brien D.M., Jenson J., Francis D., Wooller M.J. The influence of diet and water on the stable oxygen and hydrogen isotope composition of *Chironomidae* (Diptera) with paleoecological implications. *Oecologia.*, 2009, vol. 160, pp. 225-233.
6. O'Brien D.M., Wooller M.J. Tracking human travel using stable oxygen and hydrogen isotope analyses of hair and urine. *Rapid communication in Mass Spectrometry.*, 2007, vol. 21, pp. 2422-2430.

СТИМУЛИРУЕМАЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ КРЕМНИЕВОГО ПАНЦИРЯ ДИАТОМОВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ (BACILLARIOPHYTA)

Романова Д.Ю.¹, Мосунов А.А.²

¹ФГБУН Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН
пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ

²Севастопольский государственный университет,
ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ
e-mail: driaromanova@yandex.ru

Аннотация. С развитием методов исследований расширяется понимание фундаментальных основ биоразнообразия. Новые данные пополняют диагнозы видов, указывают на особенности физиологического состояния и дают более полную картину исследуемых объектов для понимания основополагающих принципов жизни. Одним из новейших методов исследования гидробионтов является конфокальная рамановская спектроскопия, с помощью которой были получены спектрограммы и микрофотографии водорослей. Впервые рассмотрена стимулируемая биолюминесценция на клеточных культурах и подготовленных панцирях бентосных форм диатомовых водорослей (Bacillariophyta). Индукция свечения клеток не связана с процессом тактильных контактов «клетка-клетка», либо других вариантов взаимодействий. Наблюдаемое явление характерно как для отдельно лежащих клеток, так и для клеточных агрегаций. И зависит напрямую от времени экспозиции светового потока на культуру клеток, либо на подготовленные панцири диатомей.

Ключевые слова: диатомовые водоросли, кремниевый панцирь, стимулируемая биолюминесценция, эволюция.