

О ЧЕМ ГОВОРЯТ ИЗОТОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ ТЯЖЕЛОЙ ВОДЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ И МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

Лобышев В.И.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Ленинские горы 1/2, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: lobyshev@yandex.ru
Поступила в редакцию: 05.07.2018.

Аннотация. Дан обзор работ по изотопным эффектам, связанным с заменой обычной воды на тяжелую. Отмечены наиболее общие признаки биологических изотопных эффектов – адаптация, ингибирование биохимических и физиологических реакций, увеличенная стабильность к высокой температуре и другим внешним экстремальным условиям, замедление биологических часов, быстрота появления эффектов. Особое внимание уделено неожиданным эффектам малых концентраций дейтерия в воде и в воде с пониженным содержанием дейтерия.

Ключевые слова: D_2O , вода с пониженным содержанием дейтерия, живые организмы, клетки, биополимеры.

Изотопные эффекты D_2O на живых объектах начали изучать сразу после открытия дейтерия и разработки метода обогащения воды изотопом дейтерия. В первой же работе было показано, что семена табака не прорастают в D_2O [1]. В течение двух лет было проведено множество экспериментов на разных организмах, включающих одноклеточные водоросли, низшие грибы, планарии, аквариумные рыбы. Был сделан вывод о том, что тяжелая вода с концентрацией дейтерия, большей 70 % несовместима с жизнью даже для таких простых автотрофных организмов, как низшие водоросли, требующие для развития лишь воду, углекислый газ, минеральные соли и свет [2, 3]. Высказанная точка зрения лишь подтверждалась последующими работами, проводимыми на более широком наборе живых организмов. В это же время развивается химия изотопов. Однако, в то время как для большинства химических реакций с участием протона изотопный эффект проявляется в уменьшении скоростей реакции примерно в 1,5 раза, замена обычной воды на тяжелую приводит к полному торможению большинства биологических функций. В связи с этим, интерес к изучению изотопных эффектов быстро возростал, но, по политическим причинам, к 1938 г. публикации на тему тяжелой воды прекратились и возобновились лишь к середине 50-х годов. Сформулированная выше точка зрения о невозможности жизни в D_2O была опровергнута лишь в 1959 г., когда удалось получить культуры одноклеточных водорослей, жизнеспособных в 99,7 %-ной тяжелой воде. Оказалось, что при переносе водорослей из обычной воды в высококонцентрированную тяжелую воду требуется неожиданно длительный период адаптации, после которого клетки начинают вновь расти и делиться [4]. Наряду с прямой, существует также обратная адаптация при переносе культур обратно в среду с обычной водой. Это открытие не получило убедительного объяснения по настоящее время. Считается, что «функциональная адаптация имеет в своей основе смену биосинтезов на базе регуляции генной активности всех клеток или клеток регуляторных структур» [5].

Изотопные эффекты нельзя объяснить с позиций классической физики. Детальная интерпретация механизмов изотопных эффектов дейтерия весьма сложна. Наиболее существенной причиной первичных изотопных эффектов является различие в нулевых энергиях колебаний связей с атомом водорода, а сам факт существования изотопных эффектов является непосредственным следствием принципов квантовой механики. Поскольку изотопные эффекты дают непосредственную информацию об энергиях связей, этот метод успешно применяется для анализа механизмов катализа в химии и энзимологии [6]. Аналогично объясняются и изотопные эффекты в равновесии реакций с участием протона. Наряду с первичными, наблюдаются также вторичные изотопные эффекты аллостерического типа. Большое значение имеют изотопные эффекты воды как растворителя, опосредованные через изменения свойств воды при замене протия на дейтерий. Эволюцию взглядов и анализ физико-химических механизмов изотопных эффектов D_2O можно найти в монографии [7].

Ингибирующие эффекты в росте культур микроорганизмов проявляются очень быстро. Примечательно, что развитие бактерий *Deinococcus radiodurans* полностью прекращается в D_2O , хотя они выдерживают дозу ионизирующего излучения до 10000 Гр (для человека предел 5 Гр) [8]. Млекопитающие выдерживают дейтерирование лишь до 30 % дейтерия в тканевой жидкости, однако дейтерированные живые организмы и культуры тканей выдерживают более высокие температуры, давление и лучевую нагрузку. Остановка деления клеток в D_2O приводит к естественному желанию использовать D_2O для лечения опухолей. Такие работы были с успехом выполнены на лабораторных животных, но не вошли в клиническую практику [7]. Наши недавние работы показали, что даже 10%-ная тяжелая вода, принимаемая мышами для питья, увеличивает на 4 дня медианное значение продолжительности жизни мышей с инокулированной карциномой молочной железы 4Т1 [9]. При этом, важно отметить, что эффекты D_2O являются обратимыми в отличие от токсичных фармакологических препаратов. Совместное использование растворов D_2O и химио- или радиотерапии позволяет значительно сократить лучевую и/или химическую нагрузку на организм пациентов. D_2O является уникальным

агентом, не только сдвигающим фазу, но и увеличивающим период биологических часов, что может быть использовано для изучения феномена биологических часов.

Тяжелая вода стабилизирует искусственные липидные мембраны, делает их более жесткими изменяя таким образом гидрофобно-гидрофильное равновесие между мембраной и окружающей средой [10]. Универсальным ответом на смену воды в растворах биополимеров является повышение температуры денатурации, а также увеличение энтальпии плавления что обусловлено, в основном, влиянием D₂O как растворителя. Зная изотопный эффект в энтальпии плавления льда можно провести оценку количества «плавающейся» связанной воды, теряющей одну степень свободы при денатурации белка. Используя гармоническое приближение можно оценить вклад, вносимый связанной водой в нативное состояние биополимера. Показано, что процесс плавления фибриллярного коллагена в значительной степени определяется изменением свойств связанной воды, в то время как этот вклад составляет небольшую часть от полной теплоты плавления глобулярной РНК-азы [7]. Еще большую информацию о роли связанной воды в стабилизации биополимеров можно получить из экспериментов в воде с переменным изотопным составом от 0 до 100 % дейтерию. Нами были предложены модели, включающие характер связывания дейтерия с белком и температуру денатурации и объясняющие нелинейные зависимости температуры денатурации биополимера от содержания дейтерия в воде [7, 11]. Эта модель может быть использована также для других активационных процессов в среде с переменным бинарным составом для решения вопросов предпочтительной сольватации. Сходство профилей зависимостей температуры денатурации миозина и его фрагментов, и кинетического изотопного эффекта в гидролизе АТФ от концентрации дейтерия в воде указывает на тесную связь термодинамики и кинетики на микроуровне [12], что является подтверждением концепции Гурвича А.Г., высказанной еще в 1930 г. [13]. Исследование кинетических изотопных эффектов в воде с разной концентрацией дейтерия в англоязычной литературе носят название “proton inventory method” и дают возможность определить количество протонов, участвующих в химических реакциях с переносом протона. Используя этот метод, мы показали, что стадия спада M412 фотоцикла бактериородопсина сопровождается переносом двух протонов, а стадия спада O640 только одного протона [14].

Как видно из приведенных примеров, изучение изотопных эффектов D₂O и растворов с переменным содержанием дейтерия дают богатую информацию на разных уровнях организации биологических систем. Экстраполяция известных изотопных эффектов тяжелой воды к природным значениям концентрации дейтерия не позволяет ожидать значимых биологических эффектов при небольших отклонениях концентрации дейтерия от ее природного содержания. Здесь уместно напомнить, что природная вода является смесью изотопных форм молекул вследствие наличия стабильных изотопов ¹⁶O, ¹⁷O, ¹⁸O, ¹H, ²H. Относительное содержание наиболее распространенных изотопов дейтерия и ¹⁸O в природных водах составляет в среднем 0,015 % (150 ppm) и 0,2 % и варьирует в пределах 0,0079-0,0195 % и 0,1887-0,2083 % соответственно, вследствие фракционирования изотопов воды при фазовых переходах пар-жидкость-лед (снег), при сорбции и фильтрации в природных процессах [15]. Тем не менее, такие работы были выполнены еще в 30-е годы, но они долгое время не возобновлялись и не цитировались. Поэтому их хочется описать наиболее подробно. Экспериментально было показано, что небольшие изменения естественного изотопного состава воды, могут приводить к неожиданно большим эффектам, часто противоположным действию концентрированной тяжелой воды.

Эксперименты с водой, слегка обогащенной дейтерием, были выполнены в 1933-1935 гг. [16-38]. Исследовано действие воды с содержанием дейтерия 0,06 % на развитие водоросли *Spirogyra nitida*, культивируемой под рассеянным светом при температуре 10-14 °С. Для филаментов водоросли в воде с повышенным содержанием дейтерия (в дальнейшем для краткости будем использовать термин «утяжеленная» вода) было характерно уменьшение подвижности, значительное уменьшение количества разрывов и увеличение длительности жизни [17]. В контрольном опыте в дистиллированной воде филаменты рвались на более мелкие фрагменты, а их распределение по длинам было более широким. В одном из опытов филаменты в «утяжеленной» воде вовсе не имели разрывов в течение полутора месяцев [18, 19]. Разрывы наблюдали лишь в длинных филаментах, но не в коротких – использованных для дальнейших количественных исследований. В обычной воде у 322 клеток, содержащихся в 15 коротких филаментов из 5-50 клеток, средняя продолжительность жизни одной клетки составила 3 дня, в то время как в «утяжеленной» воде у 355 клеток, содержащихся в 16 филаментах, средняя продолжительность жизни клеток составляла 6 дней. Увеличенная продолжительность жизни в «утяжеленной» воде наблюдалась во всех случаях, независимо от средней длины клетки. В то же время, увеличение концентрации дейтерия в воде не приводило к заметным изменениям в скорости деления клеток или их удлинения, однако вследствие большей долговечности клеток наблюдалось большее число делений клеток [22]. Особо хочется подчеркнуть, что многократная (до 6 раз) перегонка воды не изменила получаемых результатов. Это дает основание утверждать, что наблюдаемые эффекты не обусловлены наличием посторонних примесей в «утяжеленной» воде, появившихся в процессе электролиза.

В работе [21] было установлено, что «утяжеленная» вода с малой концентрацией дейтерия оказывает влияние на продолжительность жизни *Spyrogira* только в фотосинтезирующих водорослях на свету, но не в темноте. Из 1088 клеток водоросли в 0,47 % D₂O через два дня при освещенности примерно 646 лк развивается

72 % клеток, тогда как только 18 % из 1129 клеток оставались живыми в темноте. В обычной воде 32 % из 1266 развивались на свету той же интенсивности и 16 % из 789 клеток в темноте. На основании этого эксперимента авторы делают вывод о том, что «утяжеленная» вода способствует процессу фотосинтеза. В экспериментах с морскими диатомовыми водорослями *Nitzschia bilobata* в морской воде, содержащей 1 % дейтерия, было обнаружено 16-ти процентное увеличение лаг-периода на кривых роста. Для другой водоросли *N. closterium* отмечается противоположная тенденция, однако, этот результат статистически не достоверен. Изменений стационарной концентрации диатомовых в воде с различным изотопным составом не обнаружено [29]. Наряду с ингибирующим (или стабилизирующим) влиянием «утяжеленной» воды было обнаружено также стимулирующее действие на живые организмы. Так количество клеток *Euglena gracilis*, культивируемых в течение 45 суток при температуре 17-20 °С, было увеличено на 15,6 % в среде, содержащей 0,06 % дейтерия. При этом количество подвижных микроорганизмов по сравнению с контролем возросло примерно в 2,3 раза [19].

Аномальное влияние «утяжеленной» воды было подтверждено в опытах с низшими грибами [24, 25]. Исследуя *Saccharomyces cerevisiae* в среде Вильямса в электролизной воде с содержанием 0,06 % дейтерия за 143 часа опыта, он не обнаружил различий между контролем и опытом в числе клеток на единицу объема, в количестве почек, числе мертвых или поврежденных клеток, проницаемых для метиленового синего. В то же время в «утяжеленной» воде общий объем клеток после центрифугирования в мерных пробирках был на 20 % больше, чем в контроле, хотя средний размер клеток в опыте лишь на 3% больше. Клетки в «утяжеленной» воде были более однородны по размеру – коэффициент вариации формы на 8% меньше, чем в контроле. Сухой вес дрожжей оказался больше на 26 %, что свидетельствует о большем количестве синтезированного твердого вещества в клетках, выросших в среде с повышенным содержанием дейтерия. В работе [25], наряду с вышеуказанными результатами, отмечается, что дрожжи, выращенные в «утяжеленной» воде, содержат больше гликогена, но меньше азота. Наибольшее влияние малых добавок дейтерия в среде наблюдали во время быстрой клеточной пролиферации, когда соотношение средней поверхности клеток к их объему максимально.

Еще более поразительные результаты были получены Майером [26, 27]. После выращивания в течение 5 дней чистой культуры *Aspergillus sp.* в инкубаторе при температуре 37 °С в среде Пфедфера сухой вес мицелия, выросшего в среде, содержащей 0,47 % дейтерия, оказался в 16 раз больше, чем в контроле. Отмечены также морфологические изменения культур, выросших в средах с различным изотопным составом. В обычных условиях плесень имеет плоскую форму и равномерно распределенные плодовые тела. В «утяжеленной» воде плесень сильно завита, имеет провалы и напоминает рельеф коры головного мозга, плодовых тел существенно меньше, а их распределение по поверхности очень неравномерно. Исследование выделения газа при росте пекарских дрожжей в растворе Пастера, содержащем 0,25 и 0,5 % D₂O, не дали столь больших эффектов. В конце ферментации количество газа в 0,5 % D₂O было уменьшено на 6-6,5 % [31].

Не было найдено изменений в регенерации плоских червей *Phagocata gracilis* в 0,06 %-ной тяжелой воде [22]. Однако, через несколько месяцев можно было наблюдать качественное различие. В обычной воде планарии сморщились примерно до 1/5 от исходной длины тела, тогда как в «утяжеленной» воде сокращение было незначительным. Опыты с планариями были повторены с большей концентрацией дейтерия – 0,47 % и был обнаружен новый эффект. На планариях в этой воде быстро паразитировал плесневый грибок, и животные погибли в течение трех недель [32]. В некоторых опытах живые животные покрывались слизью, либо пучками мицелия. В этой же работе аналогичное ускорение роста плесневых грибов обнаружено в экспериментах с прорастающими семенами *Aquilegia*. На семенах, замоченных «утяжеленной» водой появилась большая масса мицелия белого цвета. Этот гриб в основном сапрофитен, т.к. появился, в основном, на не проросших семенах. Судя по приведенным фотографиям, контрольные животные и семена были свободны от паразитов. Результаты этой работы хорошо согласуются с данными Майера об активации роста плесени в «утяжеленной» воде.

Пытаясь понять механизм действия малых концентраций дейтерия на живые организмы, Банес провел ряд экспериментов на молекулярном уровне [23]. Ему удалось обнаружить замедление гидролиза крахмала панкреатической амилазой и ингибирование зимазного комплекса в воде, содержащей 0,06 % дейтерия. После 24-часовой инкубации амилазы в «утяжеленной» воде стадия эритродекстрина достигалась за 8 минут, а в контроле за 6 минут. Преинкубация зимазного комплекса в «утяжеленной» воде приводила к 10 %-ному уменьшению количества CO₂, причем этот эффект не менялся при увеличении времени преинкубации фермента от 16 до 166 часов. Отмечалось также, что влияние дейтерия не проявляется при проведении реакции без преинкубации фермента или при инкубации одного лишь субстрата. Банес считал, что обнаруженные изменения ферментативной активности могут быть возможной причиной влияния малых концентраций дейтерия на живые организмы. Описывая работы Банеса, следует сказать также о том, что он с 1932 г. активно исследовал влияние талой и конденсированной воды из пара на живые организмы. Основной причиной, объясняющей различное биологическое действие этих вод, он считал сохранение структурированности в талой воде и ее полное разрушение в конденсированной воде.

Влияние 0,11 % тяжелой воды испытано на мышах, зараженных саркомой [30]. Из 100 мышей с инокулированной опухолью 50 штук в течение 10 дней получали инъекции по 1 см³ «утяжеленной» воды

ежедневно внутрь опухоли и вокруг нее. Контрольная группа мышей получала инъекции обычной воды. В большинстве случаев различий в развитии опухолей не обнаружено, однако, в 12 % случаев наблюдали ускоренный рост и увеличение размеров опухоли в опытной серии. Авторы работы полагали, что этот факт нельзя объяснить случайными причинами и связывали его с активирующим влиянием «утяжеленной» воды.

Наряду с перечисленными, существуют такие работы, в которых влияние малых добавок тяжелой воды не обнаружено. Так, в воде с концентрацией дейтерия 0,05 % наблюдали лишь небольшое замедление прорастания семян и роста проростков люпина [17]. Не обнаружено также отличий от контроля в ряде биологических процессов, а именно: в ферментации пекарских дрожжей; в реакции мышей на инъекции физиологического раствора; в поведении золотой рыбки; в ритмических сокращениях гладкой мускулатуры полоски кишечника кошки; в индуцированных различными фармакологическими препаратами сокращениях образцов гладких мышц из кишечника кошки, стенок сосудов белых крыс, стенок матки морской свинки; в давлении крови и дыхании наркотизированных кошек при внутривенных инъекциях физиологического раствора, а также при действии тинктуры наперстянки. К сожалению, сравнить эти результаты с данными других авторов невозможно, поскольку в этой работе полностью отсутствует описание постановки эксперимента.

Добавленная D₂O в количестве 2,5·10⁻⁴ % не изменила характеристик роста популяции водяных блох [33]. Не наблюдалась стимуляции прорастания семян гороха *Pisum sativum* [34]. В 0,46-процентной тяжелой воде не было замечено количественных или качественных различий в следующих процессах: прорастании милдью пшеницы *Erysiphe graminis tritici*, скорости роста корешков проростков пшеницы, скорости дыхания проростков пшеницы, а также, в противоположность Майеру, в росте плесени *Aspergillus niger* [35]. «Утяжеленная» вода в концентрации 0,13; 0,7 и 5 % не изменила морфологии и скорости размножения молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus* и *L. Bulgaricus* [36]. Незначимый результат получен также в [37] при исследовании влияния 1-процентной тяжелой воды на активность каталазы и амилазы мышц и скорость гидролиза глюкозида амигдалина эмульсией из горького миндаля. Изменений в ферментативной активности не было обнаружено как сразу после добавления тяжелой воды, так и при предварительной инкубации фермента и субстрата в растворе «утяжеленной» воды в течение нескольких часов.

Чаще всего авторы работ, получивших незначимые результаты, видят причину появления эффектов малых концентраций дейтерия в других работах за счет посторонних примесей. Это мнение, хотя и может иметь отношение к некоторым работам, следует признать ошибочным. Достаточно вспомнить уже цитированную работу [17], где было показано, что многократная перегонка тяжелой воды не привела к изменению результатов. Кроме того, в ответ на замечания оппонентов, в специально выполненных работах было показано, что стимуляция роста плесени, растущей в воде, обогащенной дейтерием, не может быть обусловлена, например, примесями парафина [20, 26].

Наиболее тщательно, на наш взгляд, выполнена работа [38], в которой содержится также анализ способа приготовления воды. Показано, что для исключения дополнительных ошибок и обеспечения одинакового pH необходимо дистиллировать обычную и «утяжеленную» воду и стерилизовать растворы в одном, желательном стеклянном приборе. В противном случае растворы имеют различающиеся значения pH, что приводит к существенным изменениям результата в контрольных экспериментах. Были исследованы водоросли – *Lemna minor*, *Chlamidomonas*, *Phormidium autumnale*; безхлорофилльные организмы: грибы – *Rhizopus nigricans*, *Penicillium eitrinum*; бактерии – *B. cloacae*, *B. subtilis*, *Sarcina lutea*; дрожжи – *B. cerevisiae*. Показано, что в воде, содержащей 0,1 % дейтерия, значительно активируется развитие водорослей (у *Lemna* активация выражена слабо), сильно угнетается рост как скороспелых, так и не скороспелых бактерий, несколько ускоряется рост дрожжей. Вода, содержащая 0,13 % дейтерия, значительно замедляет развитие проростков овса, но их реакция на освещение такая же, как в контроле. В этой же работе было проверено влияние разбавленной тяжелой воды на подвижность микроскопических водяных змей *Ancylus tasmanicus* длиной 2-3 мм. В воде, содержащей 0,13 % дейтерия, подвижность змей уменьшалась через 2-3 дня и через 3 недели движения практически полностью прекращались. Этот феномен оказался обратимым. После смены «утяжеленной» воды на обычную, через 3 дня змеи ползали и активно питались.

На этом литературные источники 30-х годов, описывающие влияние малых добавок тяжелой воды на живые организмы, исчерпываются. После длительного перерыва аналогичные работы были возобновлены в 60-х годах. В работах Б.Н. Родимова с сотр. [39-41] было показано активирующее влияние талой воды, полученной из снега, на ряд биологических процессов и было получено увеличение продуктивности сельскохозяйственных животных и растений. В эксперименте с двумя группами по 14 кур несушек, пивших обычную и снеговую воду, было получено, что за время с декабря по март среднее количество яиц на одну несушку и общий вес яиц в опытной группе в 2 раза больше, чем в контрольной. Отмечается, что, хотя подопытные куры пили талой воды больше, корма они потребляли столько же, сколько контрольные. За это же время суммарный привес порослят в опытной группе оказался в 1,4 раза больше, чем в контрольной. Сила роста семян пшеницы, замоченных талой водой была на 41 % больше, чем в контроле. Огурцы, которые поливали талой водой после высадки рассады дали урожай 210 %, а те, у которых замачивали еще и семена – 290 %, урожай редиса составил 230 % [39].

К этому времени уже существовала хорошо разработанная теория фракционирования изотопов при фазовых переходах воды. Наиболее «облегченной» является вода из свежеснежавшего снега. Поэтому рабочей гипотезой, объясняющей влияние талой воды на животных и растения, стало стимулирующее влияние пониженной концентрации дейтерия в воде. Однако, оставалась еще альтернативная гипотеза об особых свойствах «структурированной» талой воды, существующая еще с 30-х годов. Последующий эксперимент позволил устранить эту альтернативу. Три группы семян ячменя замачивали около 8 часов в разных водах – талой снеговой, талой с добавлением недостающего количества тяжелой воды (0,003 %) и контрольной водопроводной [40]. Затем семена подсушивали и высевали. Вторым и третьим вариантами опыта дали сходные результаты. В первом опыте со снеговой водой вес зерна оказался на 18 %, а биологическая урожайность на 25 % больше. Аналогичный полевой эксперимент с пшеницей дал еще более убедительное подтверждение (22 и 56 % соответственно) гипотезы о стимулирующем влиянии воды с пониженной концентрацией дейтерия. Эти эксперименты показали также, что возможное объяснение наблюдаемых эффектов за счет не идентифицированных высокоактивных примесей несостоятельно, поскольку стимулирующий эффект снимался добавлением небольшого количества тяжелой воды.

В работе [41] представлены результаты исследований разнообразных биологических объектов, где было показано, что снеговая вода задерживает старение культур Хела, Хеп-2, детройт-6, 580, печени и фибробластов куриных эмбрионов. Даже через 7-8 суток не было замечено дегенерации и еще наблюдали рост культур. Был проведен также опыт с повышенным до 3 % содержанием дейтерия в питьевой воде мышей. Контролем в этом случае была обычная вода. Вес новорожденных мышат в этом опыте был на 20 % меньше, а среди мышат преобладали самцы (около 75 %). Мышата росли медленнее, половое развитие у них запаздывало. Самки второго поколения оказались неспособными к лактации и их мышата погибали. Третьего поколения получить не удалось. Было показано также, что дейтерий аккумулируется в яичниках белых мышей, что приводит к морфологическим изменениям на всех стадиях развития яйцеклеток. Использование талой воды в качестве питьевой привело к качественно противоположным результатам, а развитие яйцеклеток стимулируется водой с пониженной концентрацией дейтерия.

Качественно похожие результаты были получены в опытах с мухами дрозофилами. В контрольной среде, содержащей водопроводную воду, соотношение количества самцов и самок было равно 48:52. В среде, содержащей снеговую воду и воду с искусственно пониженной концентрацией дейтерия количество самок увеличилось в первом поколении 41,4:58,6 и в третьем поколении возросло до 39,6:60,4. Погрешность в работе не указана, но тенденцию можно считать достоверной, поскольку в опыте было использовано 32 тысячи особей. В среде с «утяжеленной» водой, содержащей 2 и 3 % дейтерия, напротив, количество самцов увеличивается, а соотношение самцов и самок оказалось равным 56:44 и 53:47 соответственно.

Аналогично описанному выше эксперименту с ячменем и пшеницей были поставлены опыты с хлореллой [41]. После культивирования получили среднее увеличение массы хлореллы в снеговой воде на 88 % и уменьшение на 27 % в снеговой воде с добавлением 0,003 % D_2O относительно массы хлореллы в контрольном опыте. Таким образом, еще раз подтверждается именно специфичность действия малых концентраций дейтерия в воде. Авторы работы [41] обратили также внимание на возможные демографические последствия вариаций изотопного состава питьевой воды. Так, например, число долгожителей с возрастом более 100 лет на 10^6 человек в среднем по РФ составляет 81 человек, в то время, как в Чечено-Ингушетии – 353, а в Якутии 324 человека. Первые из группы долгожителей пьют талую воду из горных рек, а вторые снеговую воду длительное время в течение года. Конечно, приведенные статистические данные можно объяснять и другими причинами, но отмеченная корреляция, безусловно, заслуживает внимания.

Известна еще одна работа [42], в которой показано, что овес быстрее прорастает в воде, полученной из антарктического льда, облегченного по кислороду на 49 % и по дейтерию на 400 % относительно стандарта SMOW.

На наш взгляд, основным недостатком вышеописанных работ является отсутствие зависимостей наблюдаемых эффектов от концентрации дейтерия в воде. Очевидно, что эта зависимость должна быть немонотонна, поскольку большие концентрации дейтерия всегда приводят к ингибированию, а малые могут оказывать активирующее действие. Поэтому выбор одной произвольной концентрации дейтерия в опытах с организмами, имеющими различную чувствительность к изменениям изотопного состава воды, может привести к различным, в том числе и незначимым результатам.

Продолжая это направление исследований в широком диапазоне концентраций дейтерия в воде, мы обнаружили, что наряду с ингибированием гидролитической активности мембранного препарата Na, K-АТФазы высокими концентрациями D_2O , наблюдается значительная активация фермента при концентрациях дейтерия менее 1 % [43]. Важно, что активационный эффект наблюдается при физиологической температуре, но отсутствует при температуре 13 °C [44]. Аналогичная бифазная картина наблюдается для мембранного препарата Са-АТФазы, но активация при малых концентрациях дейтерия у миозиновой АТФазы отсутствует. Очевидно, что молекулярные механизмы действия высоких и низких концентраций дейтерия в воде различны, а для

появления активации фермента в данной модели требуется наличие белка, липида и воды. В продолжение этих исследований были изучены процессы регенерации морских гидроидных полипов в воде с переменным содержанием дейтерия. Чтобы учесть эффекты, связанные с распределением морской воды, вместо D₂O в контрольные образцы добавляли эквивалентное количество дистиллированной воды. В результате, был также обнаружен бифазный ответ, т.е. ингибирование высокими концентрациями дейтерия и значительная активация малыми добавками D₂O [45].

Еще в 30-е годы полярники обнаружили бурное цветение планктона у кромки льдов в арктических морях. В то время доминирующей точкой зрения на причину этого феномена были особые свойства талой воды, сохранившей структуру льда и обладающей, по этой причине, активирующим биологическим действием. Изучение вертикальной структуры изотопного состава льда и его связь с содержанием фитопланктона была выполнена на дрейфующей станции СП-22. В кернах льда мощностью около трех метров послойно исследовали изотопный состав растаявшей воды, который оказался периодически изменяющимся по толщине льда вследствие его генезиса при смене сезонов («облегчение» за счет выпадающего снега и «утяжеление» за счет намерзания из океанской воды) [46]. Измерения оптических спектров образцов из керна льда позволило определить количество сине-зеленых и зеленых микроводорослей. Оказалось, что минимальное количество фитопланктона содержится в воде с изотопным составом, соответствующем изотопному составу древнего океана, а при уменьшении и увеличении количества тяжелых изотопов воды наблюдается увеличение концентрации водорослей [47, 48]. Как уже упоминалось ранее биологическую активность талой воды из снега можно устранить соответствующей добавкой D₂O [39-41]. Поэтому можно считать, что вспышка жизни на границе тающего льда обусловлена изменением изотопного состава воды.

В 90-х годах стала доступна вода, обедненная дейтерием, и появились работы, свидетельствующие о стимулирующих свойствах такой воды и даже ее использовании для терапии онкологических заболеваний [49, 50]. Таких работ с оптимистическим результатом довольно много, но в них не исследуется зависимость от концентрации дейтерия в используемой воде. Поэтому сошлемся лишь на последний обзор [51] и наиболее интересные, с нашей точки зрения, работы [52, 53]. Нами были изучены изотопные эффекты дейтерия воды в широком диапазоне концентраций от 4ppm на биологических объектах разных уровней организации с целью выявления возможных общих закономерностей. Объектами исследований послужили: Na, K- АТФ-аза из солевых желез утки, сперматозоиды быка, человека, лягушки, икринки и сперматозоиды вьюна, роговые катушки, семена амаранта, кресс-салата и пшеницы, ряска [54]. Полученные результаты показывают, что биологические объекты чувствительны к вариациям изотопного состава воды вблизи ее природного содержания. Уменьшение содержания дейтерия в воде, как и его небольшое увеличение, может приводить как к активации, так и ингибированию биологических функций. Величины биологических изотопных эффектов, обусловленных малыми вариациями концентрации дейтерия, могут превышать известные эффекты, наблюдаемые в тяжелой воде с высокой концентрацией дейтерия.

В качестве итога рассмотрения биологического действия малых вариаций изотопного состава воды около ее природного содержания, а также воды обедненной дейтерием можно утверждать, что в интервале концентраций дейтерия от 4 ppm до 10000 ppm (1 %) можно получить как активацию, так и ингибирование в живых и модельных системах. В отличие от высоких концентраций дейтерия в воде, ингибирующих разнообразные биологические процессы, говорить об универсальном активирующем влиянии воды с уменьшенной концентрацией дейтерия некорректно.

Список литературы / References:

1. Lewis G.N. The biochemistry of water containing hydrogen isotope. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1933, vol. 55, no. 8, pp. 3503-3504.
2. Taylor H.S., Swingle W.W., Eyring H., Frost A.A. The effect of water containing the isotope of hydrogen upon fresh water organisms. *J. Cell Comp. Physiol.*, 1933, vol. 4, no. 1, p.1-8.
3. Lewis G.N. The biology of heavy water. *Science*, 1934, no. 2042, pp. 151-153.
4. Crespi H.L., Archer S.M., Katz J.J. Cultivation of microorganisms in heavy water. *Nature*, 1959, vol. 184, no. 4687, pp. 729-730.
5. Хлебович В.В. *Акклимация животных организмов*. Л: Наука, 1981, 136 с. [Khlebovich V.V. *Acclimation of animal organisms*. L: Nauka, 1981, 136 p. (In Russ.)]
6. Рогинский С.З., Шноль С.Э. *Изотопы в биохимии*. М: Изд. АН СССР, 1963, 380 с. [Roginsky S.Z., Shnoll S.E. *Isotopes in biochemistry*. М: AS USSR, 1963, 380 p. (In Russ.)]
7. Лобышев В.И., Калиниченко Л.П. *Изотопные эффекты D₂O в биологических системах*. М., Наука, 1978, 213 с. [Lobyshev V.I., Kalinichenko L.P. *Isotope effects of D₂O in biological systems*. М., Nauka, 1978, 213 p. (In Russ.)]
8. Никитин Д.И., Оранская М.Н., Лобышев В.И. Специфичность отклика бактерий на вариации изотопного состава воды. *Биофизика*, 2003, т. 48, вып. 4, с. 678-682. [Nikitin D.I., Oranskaya M.N., Lobyshev V.I. The specificity of response of bacteria to variations in the isotopic content of water. *Biophysics*, 2003, vol. 48, no. 4, pp. 678-682. (In Russ.)]

9. Косенков А.В., Гуляев М.В., Лобышев В.И., Юсубалиева Г.М., Баклаушев В.П. Обратимое дейтерирование тканевой жидкости и биополимеров в нормальных и опухолевых тканях мышей. *Биофизика*, 2018, т. 63, вып. 4. [Kosenkov A.V., Gulaev M.V., Lobyshev V.I. [et al.] Reversible Deuterium Exchange of Tissue Fluid and Biopolymers in Normal and Tumor Tissue of Mice. *Biophysics*, 2018, vol. 63, no. 4 (In Russ.)]
10. Lobyshev V.I., Gianic T., Masarova M. Changes in vesicular membrans ESR spin label parameters upon isotope solvent substitution. *General Physiology and Biophysics*, 1987, no. 6, pp. 297-302.
11. Lobyshev V.I. Proton inventory method in thermodynamics of heat transition in biopolymers. In "Water and Ions in Biological Systems". Ed. By P. Lauger, L. Packer, V. Vasilescu. Birkhauser Verlag, Basel, 1988, pp. 381-386.
12. Лобышев В.И., Вишневецкая З.И. Анализ кинетических изотопных эффектов в смесях H₂O-D₂O в ферментативном катализе. Способ выявления роли конформационно-динамических процессов. *Биофизика*, 1984, т. 29, вып. 2, с. 184-189. [Lobyshev V.I., Vishnevskaya Z.I. Analysis of kinetic isotope effects in H₂O- D₂O mixtures in the enzyme catalysis – detection of conformational-dynamic processes. *Biophysics*, 1984, vol. 29, no. 2, p. 184-189. (In Russ.)]
13. Gurwitch A.G. *Hystologischen Grundlagen der Biologie*, Iena, Fisher, 1930, pp. 310.
14. Lobyshev V.I., Li Qingguo, Cheng Jiji. The solvent isotopic effect of heavy water on kinetics of the intermediates M412 and O640 of bacteriorhodopsin photocycle. *J. Fudan Univ. (Natural Sci.), China*, 1990, vol. 29, no. 3, pp. 327-334.
15. Ферронский В.И., Поляков В.А. *Изотопия гидросферы Земли*. М., Научный мир, 2009, 632 с. [Ferronsky V.I., Polyakov V.A. *Isotopy of the Earth hydrosphere*. М., Nauchny mir, 2009, 632 p. (In Russ.)]
16. Barnes T.C. A possible physiological effect of the heavy isotope of H in water. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1933, vol. 55, no. 10, pp. 4332-4333.
17. Barnes T.C. Futher observation on the physiological effect on the heavy hydrogen isotope on Spirogyra. *Amer. J. Botany*, 1933, vol. 20, no. 10, p. 181-182.
18. Barnes T.C., Larson E.J. Futher experiments on the physiological effect of heavy water and of ice water. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1933, vol. 55, no. 12, pp. 5059-5060.
19. Barnes T.C. The effect of heavy water of low concentration on Euglena. *Science*, 1934, vol. 79, no. 2050, p. 370.
20. Barnes T.C. Alleged simulation of moulds by paraffin in heavy water. *Nature*, 1934, vol. 134, no. 3389, pp. 573-574.
21. Barnes T.C., Larson E.J. The effect of heavy water of low concentration on Spirogyra, Planaria and enzyme action. *Protoplasma*, 1934, Bd. 22, H. 3, pp. 431-443.
22. Barnes T.C., Jahn T.L. Properties of water of biological interest. *Quart. Rev. Biol.*, 1934, vol. 9, no. 3, pp. 292-341.
23. Barnes T.C., Gaw H.Z. The chemical basis for some biological effects of heavy water. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1935, vol. 57, no. 3, pp. 590-591.
24. Richards O.W. The growth of yeast in water containing deuterium. *Amer. J. Botany*, 1933, vol. 20, no. 10, pp. 679-680.
25. Richards O.W. The effect of deuterium on the growth of yeast. *J. Bacter.*, 1934, vol. 28, no. 3, pp. 289-294.
26. Mayer S.L. Alleged stimulation of moulds by paraffin in heavy water. *Nature*, 1934, vol. 134, no. 3391, p. 665.
27. Mayer S.L. Deuterium oxide and Aspergillus. *Science*, 1934, vol. 79, no. 2044, pp. 210-211.
28. Macht D.I., Davis M.E. Some pharmacological experiments with deuterium. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1934, vol. 56, no. 1, p. 246.
29. Fox D.L., Cupp E.E., McEwen G.F. Low concentration of deuterium oxide and the growth of marine diatoms. *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.*, 1936, vol. 34, no. 5, pp. 575-581.
30. Rea C.E., Yuster S. Effect of deuterium oxide on rat sarcoma R-39. *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.*, 1934, vol. 39, no. 9, pp. 1058-1060.
31. Shoup C.S., Mayer S.L. The action of deuterium oxide in low concentration on the course of gas production by brewer's yeast. *J. Tennessee Acad. Sci.*, 1935, vol. 10, no. 2, pp. 127-130.
32. Larson E.J., Barnes T.C. Parasitism in heavy water of low concentration. *Nature*, 1934, vol. 133, no. 3371, pp. 873-874.
33. Terao A., Inoue Y. Effect of the heavy water on the population growth of the water-flee, Moina macrocopa strauss. *Proc. Imp. Acad. (Tokyo)*, 1934, vol. 10, no. 8, pp. 513-514.
34. Brun J., Tronstad L. Some germination experiments with peas in heavy water. *K. Norske Vidensk. Selik. Fozhandl (Trondheim)*, 1935, vol. 7, (paper 48), pp. 171-173.
35. Curry J., Pratt R., Trelease S.F. Does dilute heavy water influence biological processes. *Science*, 1935, vol. 81, pp. 275-277.
36. Weiser H.H. Influence of deuterium oxide on growth and morphology on lactobacilli. *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.*, 1937, vol. 36, no. 2, pp. 151-152.

37. Fox D.L. Concerning enzymic reactions in heavy water. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1935, vol. 6, no. 3, pp. 405-424.
38. Ewart A.J. The influence of heavy water on plants. *J. Exp. Biol. Med.*, 1935, vol. 13, no. 1, pp. 9-15.
39. Родимов Б.Н. Снеговая вода – стимулятор роста и продуктивности животных и растений. *Сельское хозяйство Сибири*, Омск, 1961, № 76, с. 66-69. [Rodimov B.N. Water from snow – stimulator for growth and productivity of animals and plants. *Selskoe khozyajstvo Sibiri*, Omsk, 1961, no. 76, pp. 66-69. (In Russ.)]
40. Родимов Б.Н., Маршунина А., Яфарова И. Действие снеговой воды на живые организмы. *Сельскохозяйственное производство Сибири и Дальнего Востока*. Омск, 1965, № 4, с. 56-57. [Rodimov B.N., Marshunina A., Yafarova I. The influence of snow water on living organisms. *Selskokhozyastvennoe proizvodstvo Sibiri I Dalnego Vostoka*, Omsk, 1965, no. 4, pp. 56-57. (In Russ.)]
41. Торопцев И.В., Родимов Б.Н., Маршунина А.М., Яфарова И.О., Садовникова В.И., Лобина И.Г. Биологическая роль тяжелой воды в живых организмах. *Вопросы радиобиологии и гематологии*. Изд. Томского ун-та, 1966, с. 118-126. [Toroptsev I.V., Rodimov B.N., Marshunina A. [et al.] Biological role of heavy water in biological systems. *Voprosy radiobiologii I gematologii*, Tomsk, Tomsk Univ., 1966, pp. 118-126. (In Russ.)]
42. Gleason J.D., Friedman I. Oats may grow better in water depleted in oxygen-18 and deuterium. *Nature*, 1975, vol. 256, no. 5505, p. 305.
43. Лобышев В.И., Твердислов В.А., Яковенко Л.В., Фогель Ю. Активирование Na, K-АТФазы малыми концентрациями D₂O, ингибирование-большими. *Биофизика*, 1978, т. 23, вып. 2, с. 390-391. [Lobyshev V.I., Tverdislov V.A., Vogel J., Yakovenko L.V. Activation of Na, K-ATPase by low concentrations of D₂O, inhibition by high-concentrations. *Biophysics*, 1978, vol. 23, no. 2, pp. 390-391. (In Russ.)]
44. Лобышев В.И., Фогель Ю., Яковенко Л.В., Резаева М.Н., Твердислов В.А. D₂O как модификатор ионной специфичности Na, K-АТФазы. *Биофизика*, 1982, т. 27, вып. 4, с. 595-603. [Lobyshev V.I., Vogel J., Yakovenko L.V., Rezaeva M.N., Tverdislov V.A. D₂O as a modifier of ionic specificity of Na,K-ATPase. *Biophysics*, 1982, vol. 27, no. 4, p. 595-603. (In Russ.)]
45. Лобышев В.И. Аномальное активирующее влияние тяжелой воды малой концентрации на регенерацию гидроидных полипов. *Биофизика*, 1983, т. 28, вып. 4, с. 666-668. [Lobyshev V.I. Activating influence of small concentration heavy water on the regeneration of hydroid polyp *Obelia geniculata*. *Biophysics*, 1983, vol. 28, no. 4, pp. 666-668. (In Russ.)]
46. Мельников И.А., Лобышев В.И. Фракционирование ¹⁸O в снежно-ледяном покрове центрального арктического бассейна. *Океанология*, 1985, № 2, с. 237-241. [Melnikov I.A., Lobyshev V.I. Fractionating of ¹⁸O within snow-ice cover in the central Arctic Ocean. *Okeanologiya*, 1985, no. 2, pp. 237-241. (In Russ.)]
47. Лобышев В.И., Мельников И.А., Есиков А.Д., Нечаев В.В. Исследование изотопного состава кислорода арктического дрейфующего льда в связи с проблемой активации роста микроорганизмов на границе тающего льда. *Биофизика*, 1984, т. 29, вып. 5, с. 835-839. [Lobyshev V.I., Melnikov I.A., Esikov A.D., Nechaev V.V. Study of oxygen isotope composition of arctic drifting ice in relation to activation of phytoplankton growth on the boundary of melting ice. *Biophysics*, 1984, vol. 29, no. 5, pp. 835-839. (In Russ.)]
48. Николаев С.Д. Изотопно-кислородная палеотермия мирового океана в мезо-кайнозой. Состояние проблемы. В кн.: *VII Всес. Симп. по стабильным изотопам в геохимии*. М., изд. АН СССР, 1978, с. 317-319. [Nikolaev S.D. Isotope-oxygen paleothermy of global ocean in meso-Cenozoic. Status of the problem. In.: *VII Vses. Symp. po Stabilnym izotopam v geohimii*. М., AN USSR, 1978, pp. 317-319. (In Russ.)]
49. Somlyai G., Janeso G., Jakli G., Vass K., Barna B., Lakies V., Gaal T. Naturally occurring deuterium is essential for the normal growth rate of cells. *FEBS*, 1993, vol. 317, no. 1-2, pp. 1-4.
50. Somlyai G., Laskay G., Berkenyi T., Galbacs Z., Galbacs G., Kiss S.A., Jakli Gy., Jancso G. The biological effects of deuterium – depleted water, a possible new tool in cancer therapy. *Z. Oncol./J. Oncol.* 1998, vol. 30, no. 4, pp. 91-94.
51. Сыроешкин А.В., Титорович О.В., Плетнева Т.В., Бурдейная Т.Н. Вода, обедненная по дейтерию, как адьювантное средство при лечении онкологических заболеваний. *Микроэлементы в медицине*, 2015, т. 16, № 3, с. 29-37. [Syroeshkin A.V., Titorovich O.V., Pletneva T.V., Byrdejnaya T.N. Water depleted of deuterium as adjuvant remedy for cancer therapy. *Microelementy v medicine*, 2015, vol. 16, no. 3, pp. 29-37. (In Russ.)]
52. Самков А.А., Джимаков С.С., Барышев М.Г. [и др.] Влияние изотопного состава воды на продукцию биомассы *Rhodococcus erythropolis*. *Биофизика*, 2015, т. 60, вып.1, с. 136-142. [Samkov A.A., Dzhimak S.S., Baryshev M.G. [et al.] The influence of water isotope content on the production of biomass *Rhodococcus erythropolis*. *Biophysics*, 2015, vol. 60, no. 1, pp. 136-142. (In Russ.)]
53. Strelakova T., Evans M., Chernopiatko A. [et al.] Deuterium content of water increases depression susceptibility. The potential role of a serotonin-related mechanism. *Behavioural Brain Research*, 2015, vol. 277, pp. 237-244.
54. Киркина А.А., Лобышев В.И., Лопина О.Д. [и др.] Изотопные эффекты малых концентраций дейтерия воды в биологических системах. *Биофизика*, 2014, т. 59, вып. 2, с. 399-407. [Kirkina A.A., Lobyshev V.I.,

Lopina O.D., Doronin Yu.K., Burdeinaya T.N., Chernopyatko A.S. Isotopic effects of low concentration of deuterium in water on biological systems. *Biophysics*, 2014, vol. 59, no. 2, pp. 399-407. (In Russ.)]

TALKING ABOUT THE ISOTOPIC EFFECTS OF HEAVY WATER IN BIOLOGICAL AND MODEL SYSTEMS

Lobyshev V.I.

Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory 1/2, Moscow 119991, Russia; e-mail: lobyshev@yandex.ru

Abstract. The review is given for the isotopic effects of D₂O. The general features of the biological isotope effects are pointed out – adaptation, inhibition of biochemical and physiological reactions, increased stability to high temperature and other external extremal conditions, deceleration of biological clocks, high speed of the effects appearance. Special attention is paid to unexpected effects of small concentrations of deuterium in water and deuterium depleted water.

Key words: *D₂O, deuterium depleted water, living organisms, cells, biopolymers.*