

УДК 612.12:57.021:54.027

## ВЛИЯНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ДЕЙТЕРИЯ В ПИТЬЕВОЙ ВОДЕ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ЛЮМИНОЛ-ЗАВИСИМОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС В ХРОНИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Князева Т.Д., Хрипач Л.В., Михайлова Р.И., Рыжова И.Н., Кочеткова М.Г.

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Минздрава России, Москва, e-mail: biochim@sysis.ru

Дейтерий – стабильный изотоп водорода, содержащийся в поверхностных водах в концентрации около 0,015% (150 мг/л) в виде оксида протодейтерия. В работе изучено влияние питьевой воды с пониженным (10, 30, 60 и 90 мг/л) и повышенным (250 и 1000 мг/л) содержанием дейтерия на интенсивность индуцированной перекисью водорода люминол-зависимой хемилюминесценции сыворотки крови крыс в хроническом эксперименте. Контрольная группа животных получала питьевую воду с содержанием дейтерия 145 мг/л, соответствующим его концентрации в московской водопроводной воде. На сроки 1 и 6 мес. после начала эксперимента наблюдалось адаптивное снижение интенсивности хемилюминесцентных сигналов, наиболее выраженное у животных, получавших питьевую воду с минимальным (10 и 30 мг/л) и максимальным (1000 мг/л) содержанием дейтерия. Через 12 мес. направление эффектов сменялось на противоположное, соответствующее признакам некомпенсированного окислительного стресса. В одной из промежуточных точек (2 мес.) среднегрупповые значения показателя у подопытных животных не отличались от контроля. Полученные данные свидетельствуют о том, что на выраженность изменений изучаемого показателя окислительного статуса животных влияли два параметра – содержание дейтерия в воде и время, прошедшее от начала эксперимента.

**Ключевые слова:** питьевая вода, дейтерий, хронический эксперимент, крысы, сыворотка крови, окислительный стресс, люминол-зависимая хемилюминесценция

## THE INFLUENCE OF DEUTERIUM CONTENT IN DRINKING WATER ON THE INTENSITY OF LUMINOL-ENHANCED CHEMILUMINESCENCE OF RAT BLOOD SERUM DURING CHRONIC EXPERIMENT

Knyazeva T.D., Khripach L.V., Mikhaylova R.I., Ryzhova I.N., Kochetkova M.G.

Centre for Strategic Planning, Russian Ministry of Health, Moscow, e-mail: biochim@sysis.ru

Deuterium is a stable isotope of hydrogen, which is contained in surface waters at a concentration of about 0.015% (150 mg/L) in the form of protodeuterium oxide. We have studied the effect of drinking water with diminished (10, 30, 60, and 90 mg/L) and heightened (250 and 1000 mg/L) deuterium contents on the intensity of luminol-enhanced chemiluminescence induced by hydrogen peroxide in chronic experiment on rats. The control group of animals received drinking water with deuterium content equal to 145 mg/L, correspondingly to its concentration in Moscow tap water. For periods of 1 and 6 months after the start of experiment, an adaptive decrease in the intensity of serum chemiluminescence was observed; most pronounced changes were revealed in animals receiving drinking water with a minimum (10 and 30 mg/L) and maximum (1000 mg/L) deuterium content. After 12 months, the direction of the effects was replaced by the opposite, corresponding to signs of uncompensated oxidative stress. At one of the intermediate points (2 months), the mean values of the marker in experimental animals did not differ from the control ones. The data obtained indicate that the severity of changes in the studied marker of oxidative state was strongly influenced by two parameters – the content of deuterium in water and the time elapsed from the beginning of the experiment.

**Keywords:** drinking water, deuterium, chronic experiment, rats, blood serum, oxidative stress, luminol-enhanced chemiluminescence

Дейтерий – стабильный изотоп водорода, содержащийся в поверхностных водах в концентрации около 0,015% (150 мг/л) в виде оксида протодейтерия ДНО. К настоящему времени опубликовано значительное количество научных работ по изучению биологической активности «легкой воды», содержащей пониженные концентрации дейтерия [1–3] и предположительно обладающей благотворным влиянием на организм человека, в том числе как дополнительное защитное средство для коррекции различных патологических состояний [4–6]. Некоторые исследова-

дователи связывают адаптогенное действие «легкой воды» с ее антиоксидантными свойствами и способностью влиять на систему окислительного равновесия организма, используя для оценки скорости свободнорадикальных реакций в биопробах такие методы, как ЭПР и ЯМР [7, 8], измерение интенсивности спонтанной и индуцированной хемилюминесценции [9], определение содержания малонового диальдегида и активности антиоксидантных ферментов [10]. В то же время возможные биологические эффекты повышенных концентраций оксида дейтерия

остаются обычно за рамками исследований на лабораторных животных, хотя и предполагается по умолчанию, что они обладают повреждающим действием. Кроме того, опыты по введению животным питьевых вод с пониженными концентрациями дейтерия ограничены обычно сроками порядка одного-двух месяцев воздействия, в то время как в гигиене приняты длительные сроки моделирования натуральных условий, с проведением хронических экспериментов в течение 6–12 месяцев.

Цель исследования: сравнительный анализ влияния пониженного и повышенного содержания дейтерия в питьевой воде на показатели окислительного стресса в пробах крови лабораторных крыс в хроническом эксперименте.

### Материалы и методы исследования

Эксперимент проводился на белых нелинейных крысах с исходной массой тела 200–220 г (по 10 крыс в каждой группе). Животные содержались при естественном освещении на обычном гранулированном корме в условиях свободного доступа к исследуемым образцам питьевой воды:

– вода с содержанием дейтерия 145 мг/л, соответствующем его концентрации в московской водопроводной воде;

– вода с пониженными концентрациями дейтерия (10; 30; 60 и 90 мг/л);

– вода с повышенными концентрациями дейтерия (250 и 1000 мг/л).

Образцы питьевой воды, использованные в данном исследовании, соответствовали высшей категории качества, имели одинаковый макро- и микроэлементный химический состав и различались только по содержанию оксида дейтерия.

Через 1, 2, 6 и 12 мес. после начала опыта отбирали пробы крови из подъязычной вены крыс. В качестве показателей окислительного стресса использовали значения интенсивности люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) сыворотки крови животных, которую измеряли при температуре 37 °С, используя в качестве индуктора перекись водорода.

В состав инкубационной среды входили следующие компоненты: 140 мМ Na-фосфатного буфера (рН 7,4); 1 мМ Na<sub>2</sub>-ЭДТА (натриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты); 50 мкМ люминола (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндиона) и 10 мкл/мл сыворотки крови [11]. Запуск реакции производили добавлением перекиси водорода в конечной концентрации 6 мМ. Интенсивность возникающего хемилюминесцентного сигнала регистрировали в течение 60 с (между 10 и 70 секундами после добавления перекиси водорода) в термостатируемой ячейке люминометра «Lucifer-02М», подключенного к компьютеру. Сохраненные двоичные файлы конвертировали и переносили в компьютерную программу Microcal Origin v. 3.0 для расчета светосуммы хемилюминесцентных сигналов (общего количества импульсов света за одну минуту). Данные выражали в виде десятичных логарифмов рассчитанных светосумм, так как максимумы распределения исходных значений светосумм у людей и животных резко сдвинуты влево [12].

Достоверность межгрупповых различий определяли с помощью двустороннего непараметрического теста Манна – Уитни в программе Statistica v.6.0.

### Результаты исследования и их обсуждение

Полученные данные представлены в таблице и на рисунке в виде медиан и межквартильного размаха значений интенсивности ЛЗХЛ сыворотки крови для животных указанных экспериментальных групп.

Интенсивность ЛЗХЛ сыворотки крови, индуцированной перекисью водорода, при введении крысам питьевой воды с варьирующим содержанием дейтерия

Содержание дейтерия в питьевой воде	Длительность эксперимента			
	1 мес.	2 мес.	6 мес.	12 мес.
10 мг/л	<b>6,21 [5,72; 6,38]</b> <i>p</i> < 0,022 *	6,25 [5,88; 6,40] <i>p</i> < 0,97	<b>5,29 [5,12; 5,78]</b> <i>p</i> < 0,003 *	<b>6,04 [5,58; 6,31]</b> <i>p</i> < 0,029 *
30 мг/л	<b>6,30 [6,16; 6,43]</b> <i>p</i> < 0,043 *	6,09 [5,90; 6,20] <i>p</i> < 0,97	5,63 [5,28; 6,21] <i>p</i> < 0,075	<b>5,89 [5,79; 6,09]</b> <i>p</i> < 0,0005 *
60 мг/л	6,44 [6,25; 6,48] <i>p</i> < 0,22	6,14 [6,07; 6,31] <i>p</i> < 0,90	<b>5,57 [5,33; 5,74]</b> <i>p</i> < 0,007 *	5,78 [5,41; 6,33] <i>p</i> < 0,10
90 мг/л	6,21 [6,19; 6,47] <i>p</i> < 0,063	6,30 [6,03; 6,39] <i>p</i> < 0,58	<b>5,71 [5,01; 5,88]</b> <i>p</i> < 0,043 *	<b>5,79 [5,59; 5,96]</b> <i>p</i> < 0,001 *
145 мг/л	6,50 [6,47; 6,66]	6,31 [5,78; 6,42]	5,97 [5,84; 6,34]	5,47 [5,46; 5,52]
250 мг/л	6,48 [6,40; 6,51] <i>p</i> < 0,44	6,41 [6,04; 6,68] <i>p</i> < 0,25	5,93 [5,73; 6,16] <i>p</i> < 0,58	<b>5,78 [5,64; 5,98]</b> <i>p</i> < 0,01 *
1000 мг/л	<b>6,39 [6,09; 6,45]</b> <i>p</i> < 0,05 *	6,28 [6,13; 6,32] <i>p</i> < 0,74	5,54 [5,46; 5,97] <i>p</i> < 0,063	<b>6,07 [5,56; 6,56]</b> <i>p</i> < 0,001 *

#### Примечания:

– интенсивность ЛЗХЛ сыворотки выражена в виде десятичных логарифмов светосуммы хемилюминесцентного сигнала за одну минуту.

– среднегрупповые данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей [Q1; Q3].

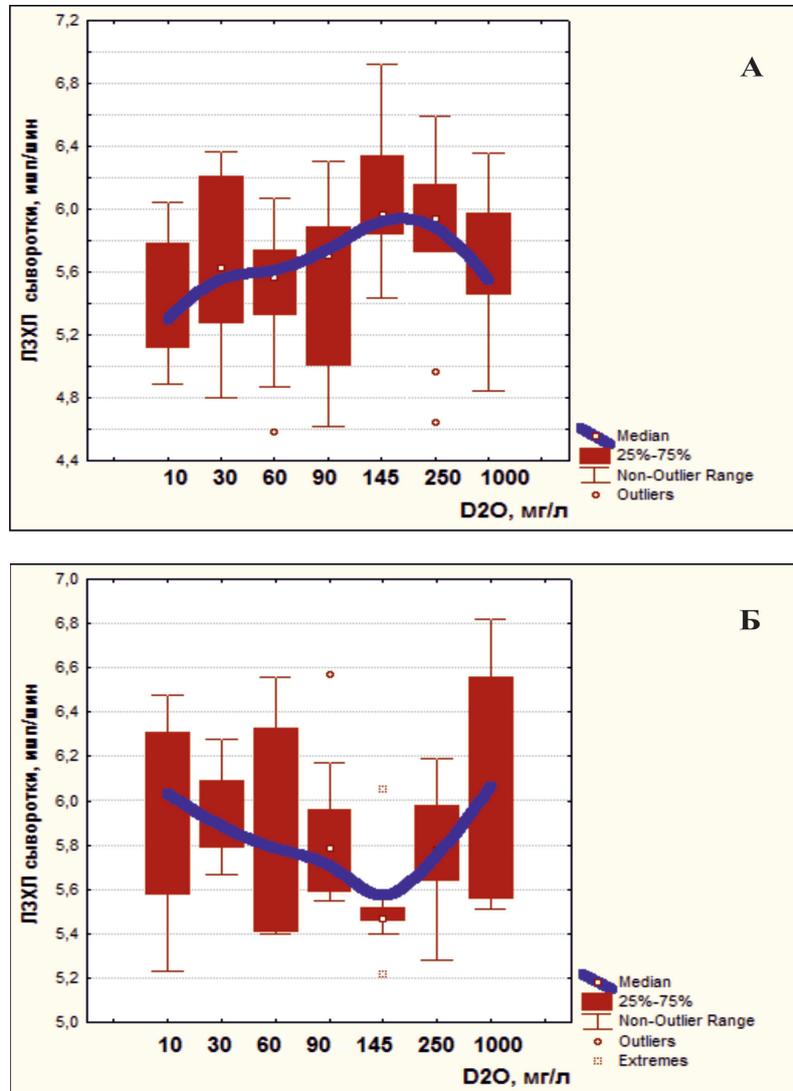
– достоверность различий рассчитана по отношению к значениям показателя в контрольной группе животных, получавшей питьевую воду с содержанием дейтерия 145 мг/л.

Как это видно из таблицы, уже на срок 1 мес. после начала эксперимента наблюдалось небольшое, но достоверное снижение интенсивности ЛЗХЛ сыворотки у крыс, получавших питьевую воду с низким (10 и 30 мг/л) и максимальным (1000 мг/л) содержанием дейтерия. Снижение интенсивности хемилюминесцентных сигналов на ранних сроках хронических экспериментов обычно связывают с адаптивным увеличением активности антиоксидантных ферментов. Через 2 мес. после начала опыта среднегрупповые значения показателя не отличались от контроля.

На срок 6 мес. снижение интенсивности ЛЗХЛ сыворотки выявлено почти у всех животных, получавших питьевую воду с пониженными концентрациями дейтерия:

в трех группах крыс (10, 60 и 90 мг/л) достоверное, в 4-й (30 мг/л) – близкое к достоверному ( $p = 0,075$ ). На грани достоверного эффекта находилось также снижение интенсивности ЛЗХЛ сыворотки у крыс, получавших воду с содержанием дейтерия 1000 мг/л ( $p = 0,063$ ).

На срок 12 мес., к окончанию хронического эксперимента, достоверные различия с контролем были зарегистрированы во всех экспериментальных группах крыс, кроме группы «60 мг/л» ( $p = 0,10$ ). При этом направление эффектов, по сравнению с более ранними сроками, изменилось на противоположное, в сторону увеличения амплитуды хемилюминесцентных сигналов и усиления скорости свободнорадикальных реакций по сравнению с контролем (рисунок).



Интенсивность ЛЗХЛ сыворотки крови у крыс, получавших питьевую воду с пониженным и повышенным содержанием дейтерия: А – через 6 мес. после начала опыта; Б – через 12 мес. после начала опыта

В целом полученные нами данные свидетельствуют о том, что на ранние сроки эксперимента достоверные изменения показателей окислительного стресса наблюдаются только в группах крыс, получавших воду с очень низким (10 и 30 мг/л) или очень высоким (1000 мг/л) содержанием дейтерия, причем эти изменения носят адаптивный характер и на сроке 2 мес. исчезают. В сходном исследовании Olariu et al. [10] (крысы Wistar, 150 и 30 мг/л дейтерия в питьевой воде, точки отбора крови 1 и 2 мес.) достоверные эффекты «легкой воды» на показатели окислительного стресса в пробах крови крыс наблюдались на оба срока опыта, однако последствия более длительного воздействия ни в этой, ни в других опубликованных работах не изучались. Как показал проведенный нами эксперимент, через 6 мес. непрерывно потребления питьевой вод с пониженным и повышенным содержанием дейтерия возвращаются адаптивные изменения интенсивности ЛЗХЛ сыворотки, характерные для раннего срока 1 мес., а через 12 мес. адаптивные изменения сменяются признаками некомпенсированного окислительного стресса, наиболее выраженного в краевых точках содержания дейтерия в воде (10 и 1000 мг/л).

### Заключение

Полученные данные свидетельствуют о том, что на выраженность изменений интенсивности ЛЗХЛ сыворотки крови крыс при введении им питьевой воды с пониженным и повышенным содержанием дейтерия влияли два параметра – содержание дейтерия в воде и время, прошедшее от начала эксперимента. Выявленные эффекты в основном носили адаптивный характер; признаки повреждения проявлялись только на срок 12 мес. после начала опыта. Наиболее выраженным действием обладали образцы воды с экстремальными концентрациями дейтерия (10 и 1000 мг/л).

### Список литературы

1. Киркина А.А., Лобышев В.И., Лопина О.Д., Доронин Ю.К., Бурдейная Т.Н., Чернопятко А.С. Изотопные эффекты малых концентраций дейтерия воды в биологических системах // Биофизика. 2014. № 59 (2). С. 399–407.
2. Лисицын А.Б., Барышев М.Г., Басов А.А., Барышева Е.В., Быков И.М., Дыдыкин А.С., Текуцкая Е.Е., Тимков А.А., Федуллова Л.В., Чернуха И.М., Джимаков С.С. Воздействие воды со сниженным содержанием дейтерия на организм лабораторных животных при различном функциональном состоянии неспецифических защитных систем // Биофизика. 2014. № 59 (4). С. 757–765.
3. Mladin C., Ciobica A., Lefter R., Popescu A., Bild W. Deuterium depletion induces anxiolytic-like effects in rats. Archives of Biological Sciences (Belgrade). 2014. № 66 (2). P. 947–953. DOI: 10.2298/ABS1402947M.
4. Kovacs A., Guller I., Krempels K., Somlyai I., Jonosi I., Gyongyi Z., Szaby I., Ember I., Somlyai G. Deuterium depletion may delay the progression of prostate cancer. Journal of Cancer Therapy. 2011. № 2 (4). P. 548–556. DOI:10.4236/jct.2011.24075.
5. Krempels K., Somlyai I., Gyongyi Z., Ember I., Balog K., Abonyi O., Somlyai G. A retrospective study of survival in breast cancer patients undergoing deuterium depletion in addition to conventional therapies. Journal of Cancer Research & Therapy. 2013. № 1 (8). P. 194–200.
6. Иванов А.А., Ушаков И.Б., Куликова Е.И., Крючкова Д.М., Северюхин Ю.С., Ворожцова С.В., Абросимова А.Н., Гаевский В.А., Сняк Ю.Е., Григорьев А.И. Легкоизотопная вода как средство лечения острой лучевой болезни // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2013. № 47 (5). С. 40–44.
7. Барышев М.Г., Басов А.А., Болотин С.Н., Джимаков С.С., Кашаев Д.В., Федосов С.Р., Фролов В.Ю., Мальшко В.В., Власов Р.В. ЯМР и ЭПР исследование влияния воды с пониженным содержанием дейтерия на показатели прооксидантно-антиоксидантной системы у лабораторных животных // Экологический вестник научных центров Черноморского экономического сотрудничества. 2011. № 3. С. 16–20.
8. Басов А.А., Быков И.М., Джимаков С.С., Шашков Д.И., Мальшко В.В., Моисеев А.В., Попов К.А., Барышев М.Г. Влияние льняного масла и питьевого рациона с пониженным содержанием дейтерия на изотопный d/h состав и функциональное состояние антиоксидантной защиты гепатобилиарной системы у кроликов при интоксикации четыреххлористым углеродом // Вопросы питания. 2016. № 85 (6). С. 30–38.
9. Барышева Е.В. Изменение показателей прооксидантно-антиоксидантной системы при снижении концентрации дейтерия в организме лабораторных животных с аллоксановым диабетом // Фундаментальные исследования. 2015. № 1–3. С. 457–461.
10. Olariu L., Petcu M., Tulcan C., Chis-Buiga I., Pup M., Florin M., Brudiu I. Deuterium depleted water antioxidant or prooxidant. Scientific Papers Veterinary Medicine. 2007. № 15. P. 265–269.
11. Князева Т.Д. Влияние загрязнения атмосферного воздуха химическими соединениями на показатели окислительного статуса у жителей Москвы: дис. ... канд. биол. наук. Москва, 2007. 209 с.
12. Хрипач Л.В. Применение свободнорадикальных методов для оценки влияния полихлорированных диоксинов и фуранов на состояние здоровья населения // Гигиена и санитария. 2002. № 2. С. 72–76.