УДК: 613.31; 663.6; 57.085.13

# ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ ПУТЕМ МЕМБРАННОЙ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ ВЛЕЧЕТ ЗА СОБОЙ ВОЗНИКНОВЕНИЕ ЭФФЕКТОВ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА IN VITRO И IN VIVO

© 2013 О.В.Зацепина<sup>1</sup>, Ф.И. Ингель<sup>2</sup>, А.А. Стехин<sup>2</sup>, Г.В. Яковлева<sup>2</sup>, О.Н. Савостикова<sup>2</sup>, А.В. Алексеева<sup>2</sup>, Т.И. Иксанова<sup>2</sup>

 $^{1}$  ЗАО «Чистая вода», г. Самара  $^{2}$  НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина, г. Москва

Поступила в редакцию 14.10.2013

В статье приводятся результаты изучения генотоксических эффектов питьевых вод с измененными физико-химическими свойствами на основные генетико-токсикологические характеристики различных биологических моделей: клеток крови человека в культуре, половых клеток самцов дрозофилы и клеток костного мозга мышей в динамике субхронического эксперимента.

Ключевые слова: электрохимическая активация воды, эффекты нестабильности генома in vitro и in vivo

Проблемы качества питьевой воды на современном этапе развития цивилизации являются ключевыми, поскольку непосредственно связаны с состоянием здоровья как ныне живущих людей, так и будущих поколений. Однако известно, что качество питьевой воды определяется не только ее химическим составом, содержанием микрофлоры, но физико-химическими свойствами [1]. Поэтому в настоящее время широкое распространение получили разнообразные технологии водоподготовки, в результате которых заметно изменяются физикохимических свойства питьевой воды. Наиболее широкое распространение получили приборы для электрохимической активации воды. Это, как правило, диафрагменные электролизеры, в которых происходит разложение воды под действием электрического тока. При таком воздействии в районе катода накапливается электрон-донорная вода (католит), характеризующаяся щелочными значениями

Зацепина Ольга Валерьевна, руководитель испытательного лабораторного центра. E-mail: zatsepinaol-ga@mail.ru

Ингель Фаина Исааковна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетического мониторинга

Стехин Анатолий Александрович, кандидат технических наук, руководитель лаборатории методологии оздоровительных технологий и медицины окружающей среды

Яковлева Галина Васильевна, кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории методологии оздоровительных технологий и медицины окружающей среды

Савостикова Ольга Николаевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории гигиены питьевого водоснабжения

Алексеева Анна Венедиктовна, ведущий научный сотрудник лаборатории гигиены питьевого водоснабжения

Иксанова Татьяна Исмаиловна, младший научный сотрудник лаборатории гигиены питьевого водоснабжения

рН и отрицательными значениями окислительновосстановительного потенциала (ОВП), а в районе анода – электрон-акцепторная вода (анолит), имеющая кислый рН и повышенные положительные значения ОВП. Хорошо известно, что при электролизе воды в районах электродов скапливаются не только протоны и ионы гидроксила, а множество других ионов, присутствовавших в электролизной среде, которые обладают выраженной токсичностью (например, ионы тяжелых металлов, ионы, содержащие хлор, серу и другие). Для снижения их концентрации некоторые производители предлагают приборы бесконтактной активации воды, в которых очищенную питьевую воду помещают в закрытые тонкостенные полиэтиленовые емкости, расположенные в районе электродов. При этом вода, находящаяся в этих емкостях, изменяет ОВП, рН, степень структурированности и другие физикохимические свойства, хотя основные механизмы процесса переноса заряда при таком мембранном электролизе до конца неясны [2].

За последние десятилетия был проведен ряд исследований по изучению биологической активности бесконтактно (с использованием мембран) электрохимически активированных вод (МЭАВ). В основном это работы на растениях и гидробионтах различных трофических уровней [3]. Несмотря на то, что до сих пор отсутствуют сведения о скольконибудь регулярном изучении безопасности или хотя бы некоторых токсикологических характеристик питьевых вод с измененными физико-химическими свойствами, в отечественной и в зарубежной литературе имеется большое количество публикаций, описывающих положительные результаты применения МЭАВ для лечения широкого спектра заболеваний [4-8]. В то же время, имеются сведения о том, что физико-химические показатели воды оказывают влияние на процессы формирования, стабилизации и функционирования различных биологических структур, включая клеточные мембраны, белки и ДНК [9], что предполагает возможность индукции генотоксических эффектов. Поэтому мы предприняли попытку регулярного изучения генетической безопасности МЭАВ на биологических моделях разного уровня, принятых ОЕСО в качестве стандартных тестов для оценки безопасности химических соединений: половых клетках самцов дрозофилы, клетках костного мозга мышей и на культуре клеток периферической крови человека.

Материалы и методы. В экспериментах использовали московскую водопроводную воду и осмотическую артезианскую воду, полученную в ЗАО «Чистая вода» (г. Самара). Московскую водопроводную воду пропускали через систему фильтров грубой и тонкой предварительной очистки, 15 мин кипятили, отстаивали в течение суток, переливали в полиэтиленовые герметично закрывающиеся стерильные полиэтиленовые пакеты объемом 500 мл и помещали в две емкости, в каждой из которых находилась вода (католит или анолит), полученная электрохимической активацией на активаторе «Изумруд». Для получения различных МЭАВ католитов пакеты с кипяченой водой выдерживали 5, 20 или 40 минут, анолитная вода получалась при экспозиции в соответствующей воде в течение 35 минут. Артезианскую воду очищали на установке обратного осмоса, кипятили для стерилизации, переливали в стерильные полиэтиленовые пакеты и бесконтактно активировали в тех же режимах, что и московскую водопроводную воду.

Физико-химические параметры полученных вод (рН, ОВП, электропроводность, люминолзависимую хемилюминесценцию и степень структурированности) определяли стандартными способами.

1. Для оценки частоты доминантных летальных мутаций в половых клетках использовали стандартный и один из наиболее изученных объектов классической генетики – плодовую мушку Drosophila melanogaster линии Д-32 разводки института биологии развития им Кольцова РАН (линию поддерживали в ФГБУ «НИИ ЭЧиГОС А.Н.Сысина» МЗ РФ). Для проведения теста молодые самцы (50 особей в группе) в течение 48 час. пили католиты или анолит, полученные бесконтактной электрохимической активацией московской водопроводной воды (воду готовили и сменяли каждые 24 часа). Затем самцов в течение 6 часов массово скрещивали с девственными самками той же линии (1 самец х 2 самки), после чего самок для откладки яиц помещали в специальные домики, дном которых служили кюветы с кормом. Кюветы сменяли каждые 12 часов, подсчитывали количество отложенных яиц и оставляли во влажных камерах на 36 часов, а затем на каждой из них подсчитывали количество неразвившихся яиц. Яйца, не изменившие своего первоначального вида, определяли как ранние эмбриональные летали (РЭЛ), а яйца, имевшие желтую окраску – как поздние эмбриональные летали (ПЭЛ) [10]. Принято считать, что РЭЛ возникают в результате комплексного токсического и генотоксического действия изучаемого фактора на половые клетки самцов дрозофилы, а ПЭЛ – исключительно результат мутационных событий (генотоксическое действие). Эксперимент проводили в 4 повторностях. Значимость различий оценивали путем сравнения между опытными и контрольной сериями по t-критерию и критерию X<sup>2</sup>. Все подсчеты проводили на предварительно зашифрованных кюветах. Важно отметить, что тест на индукцию доминантных летальных мутаций в половых клетках самцов дрозофилы не только является аналогом теста на лабораторных грызунах, но дает схожие результаты [10]. Поэтому результаты, в нем полученные, предполагают возможность экстраполяции (по крайней мере) на животных.

2. Для оценки уровней индукции хромосомных аберраций в клетках костного мозга мышей (F1 от скрещивания CBA х C57Bl6/j, группы по 6 животных) выпаивали ad libitum католитами и анолитом, приготовленными на основе московской водопроводной воды. Мыши контрольных групп в тех же условиях пили фильтрованную, кипяченую и отстоянную московскую водопроводную воду. Эксперимент проводили в течение 30 суток, свежую порцию воды готовили и разливали в поилки 1 раз в сутки. Объем выпитой воды в каждой поилке фиксировали ежедневно. Эвтаназию животных цервикальной дислокацией проводили за сутки до начала эксперимента, через сутки после его начала и далее через 8,15 и 30 суток.

Препараты костного мозга для метафазного анализа готовили стандартным способом и шифровали. На каждом препарате анализировали 100 метафазных пластинок с хорошим разбросом хромосом и модальным числом 40±2. Учитывали одиночные и парные фрагменты, а также обмены. Частоты однонитевых разрывов (ахроматических пробелов и ГЕПов) подсчитывали отдельно и не включали в число аберраций хромосом. Кроме того, на каждом препарате при анализе 1000 ядер определяли митотический индекс и количество ядер мегакариоцитов. Статистическую оценку результатов проводили путем сравнения между опытными и контрольной сериями по критерию X<sup>2</sup>. Метод учета хромосомных аберраций, использованный в данной работе, принят МАГАТЭ в качестве официального метода биологической дозиметрии, основой которой является количественная зависимость частоты аберраций в клетках костного мозга животных от интенсивности воздействующих факторов или концентрации повреждающих агентов

3. Для культивирования клеток крови человека (практически здорового молодого некурящего донора) в образцах бесконтактно электрохимически активированной артезианской воды растворяли стандартную стерильную сухую среду RPMI 1640 с глутамином (реконструированные среды, [11]). Фракция изучаемой воды в культуре составляла 70% v/v. Для приготовления контрольной среды использовали очищенную и кипяченую артезианскую

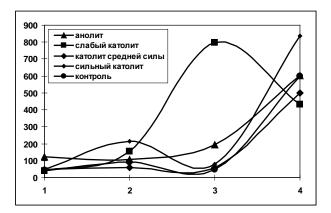
воду, не подвергшуюся активации. Работу проводили в микроядерном тесте, клетки культивировали в условиях цитокинетического блока, когда процессы, связанные с пролиферацией, протекают нормально, но расхождение дочерних ядер блокировано действием цитохалазина В [12]. Этот тест является одним из самых новых и совершенных методов цитогенетического анализа. Каждый образец воды использовали для постановки 3 культур: в две из них вводили, соответственно, 2 или 4 мкг/мл (соответственно, 36 и 72 мкл водного раствора) стандартного мутагена N-нитро-N-метил-Nнитрозогуанидина (МННГ) для оценки чувствительности генома к дополнительной малой генотоксической нагрузке, третью культуру оставляли без дополнительного воздействия. Все культуры фиксировали на 72 часу, приготовленные цитогенетические препараты шифровали и анализировали под микроскопом (10х100, масляная иммерсия) с использованием международного протокола микроядерного теста, включающего в себя оценку частоты двуядерных клеток с микроядрами и нуклеоплазменными мостами [12]. Дополнительно определяли частоту генетических повреждений во всех делящихся клетках, пролиферативную активность, спектр делящихся клеток, асимметрию деления клеток, прошедших 2 митотических цикла, и частоту апоптоза [13, 14]. Для анализа спектра делящихся клеток на каждом препарате подсчитывали 500 клеток, а для оценки всех показателей нестабильности генома - более 1000. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием критерия Спирмэна и критерия Манна-Уитни.

# Результаты.

1. Эксперименты на дрозофиле показали, что фертильность самцов различалась между группами как по итогам эксперимента и в его динамике (рис. 1). Как видно на этом рисунке, по динамике откладки яиц от контроля отличалась только одна группа — самцы которой пили католит, полученный при минимальной длительности экспозиции. Основные показатели теста приведены в табл. 1.

Как видно из таблицы, во всех группах, кроме той, самцы в которой были экспонированы католитом средней силы, количество отложенных яиц значительно превышало уровень контроля. И

только в этом случае (экспозиция мух католитом средней силы) мы наблюдали значительное увеличение как частоты ПЭЛ по сравнению с контролем, так и его доли в спектре мутационных событий. Обсуждая полученные данные, следует, прежде всего, отметить, что отличная от контроля динамика откладки яиц, наблюдавшаяся при экспозиции самцов мух слабым католитом, никак не отразилась на частоте мутаций.



**Рис. 1.** Динамика откладки яиц самками Drosophila melanogaster после скрещивания с самцами, экспонированными различными МЭАВ. По оси абсцисс – повторность опыта, по оси ординат – количество отложенных яиц

Статистический анализ выявил высокоуровневую корреляционную связь между значениями ОВП вод, которыми были экспонированы самцы мух, и частотами возникновения РЭЛ в их половых клетках (R=0,90; p=0,006), причем самые высокие частоты РЭЛ были отмечены в контроле. Важно, что увеличение фертильности мух при экспозиции слабым и сильным католитами не индуцировало повышения частоты РЭЛ и для этих вод не наблюдалось и повышения частоты поздних летальных мутаций. В то же время, выраженная генотоксическая активность была отмечена в половых клетках самцов, пивших католит средней силы. То есть, из всех изученных вариантов активации воды только католит средней силы может представлять реальную опасность для генетических структур половых клеток самцов мух.

**Таблица 1.** Влияние бесконтактно электрохимически активированных вод на фертильность самцов дрозофилы и частоты доминантных летальных мутаций в их половых клетках

<b>Наименование</b> воды	Окислительно- восстанови- тельный по-	Коли- чество отложен- ных яиц, штук	Фертиль- ность,% от кон- троля	Частоты доминант- ных летальных му- таций, %		Доля в общей частоте мута- ций	
БОДЫ	тенциал, Eh, мВ			РЭЛ	ПЭЛ	РЭЛ	ПЭЛ
контроль	322,0	776	100	8,38±0,10	$0,52\pm0,10$	0,94	0,06
анолит	275,0	1029	132,60**	8,94±0,10	$0,58\pm0,10$	0,94	0,06
слабый католит	58,8	1425	183,63**	6,67±0,16	0,63±0,16	0,91	0,09
католит средней							
силы	-16,6	663	85,44*	$3,62\pm0,20$	$0,90*\pm0,20$	0,80	0,2*
сильный католит	-62,9	1179	151,93**	5,00±0,20	$0,25\pm0,20$	0,95	0,05

Примечание: \*- различия с контролем значимы, p ≤ 0.05; \*\* - различия с контролем значимы, p ≤ 0.01

Собственный опыт работы с дрозофилой и практика других исследователей [10] показали, что мутации в половых и соматических клетках возникают параллельно. А поскольку тест на индукцию доминантных летальных мутаций в половых клетках дрозофилы является аналогом соответствующего теста на млекопитающих, мы предположили, что при употреблении католита средней силы генетические повреждения могут возникать и в соматических клетках, но не только мух, а еще и теплокровных животных. Для проверки этого предположения была проведена следующая серия экспериментов.

2. Результаты оценки частоты аберраций хромосом в клетках костного мозга мышей (рис. 2) показали, что все изученные воды вызывали генотоксические эффекты в клетках костного мозга мышей, а также оказывали влияние на митотическую активность клеток.

Так, уже через 24 часа после начала эксперимента в костном мозге животных, потреблявших разные виды католитов, отмечалось в разной степени выраженное повышение частоты клеток с ахроматическими пробелами; через 8 суток выпаивания мы наблюдали повышение частоты аберрантных клеток, причем максимальный эффект обнаружен у католита, полученного в результате самой продолжительной обработки.



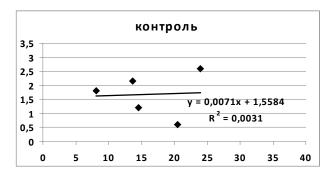


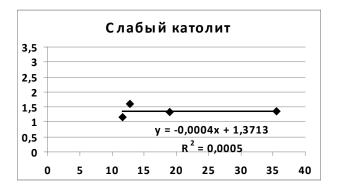
Рис. 2. Изменение частоты аберрантных клеток и митотической активности в костном мозге мышей (кратность превышения над контролем), потреблявших католиты и анолит, полученные бесконтактной электрохимической активацией московской водопроводной воды

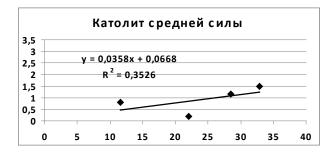
Через 15 суток эксперимента при всех видах воздействия на фоне выраженного снижения митотической активности и значительной гибели клеток в большинстве групп происходило снижение частоты аберрантных клеток (даже ниже уровня контроля), а через 30 суток никаких видимых проявлений генотоксической активности в клетках костного

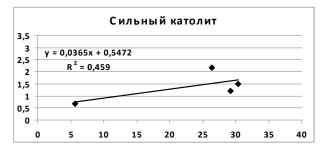
мозга животных обнаружено не было. Однако цитогенетический анализ показал, что под действием МЭАВ в большинстве случаев наблюдалось повышение митотической активности клеток костного мозга мышей, что на фоне увеличения частоты хромосомных аберраций свидетельствует о возможности закрепления генетических повреждений в поколениях делящихся клеток.

Важно отметить, что в эксперименте проявилась различная динамика соотношения основных биологических эффектов разных вод, определенная по соотношению частоты аберраций хромосом и митотической активности (рис. 3), что еще раз доказывает влияние физико-химических свойств воды на реализацию генотоксических эффектов.









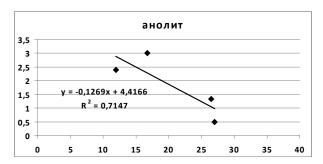


Рис. 3. Соотношение частоты хромосомных аберраций и митотической активности в костном мозге мышей при выпаивании различными видами бесконтактно электрохимически активированных вод. По оси абсцисс – продолжительность эксперимента (сутки), по оси ординат – соотношение частот хромосомных аберраций и митотического индекса

С частотами аберрантных клеток в клетках костного мозга животных (R=0,42; p=0,032) и с частотами однонитевых разрывов ДНК (R=0,58; р=0,021) прямо коррелировали значения ОВП вод, которые пили мыши. Еще более серьезное влияние на частоту однонитевых разрывов ДНК и митотическую активность клеток костного мозга оказывало содержание перекиси водорода в водах, которые пили животные (R=0.79; p=0.025 и R=-0.83, р=0,012 соответственно). Следует добавить, что католит средней силы сходным образом проявил свою генотоксическую активность на половых клетках дрозофилы и соматических клетках мышей, в то время как для остальных вод генотоксические эффекты были обнаружены только в клетках костного мозга мышей. Причина этих различий пока непонятна.

Таким образом, результаты экспериментов показали, что адаптация животных к МЭАВ проходила путем индукции генетических повреждений с последующей элиминацией поврежденных клеток, но эти процессы в большинстве случаев сопровождались повышением митотической активности. Результаты, полученные в этой серии экспериментов, позволили предположить, что подобные эффекты могут развиваться под действием МЭАВ и в организме человека. Для анализа такой возможности эксперименты были проведены на культуре клеток периферической крови человека.

3. Культивирование клеток в условиях цитокинетического блока позволяет учесть весь комплекс изменений, происходящих при трансформации стабильного генома нормальной клетки в нестабильный, характерный для клеток опухоли [15]: повышение частоты клеток с генетическими повреждениями, изменение митотической и пролиферативной активности клеток, их скорости пролиферации и симметрии деления, а также частоты запрограммированной гибели клетки – апоптоза [12, 13]. Однако данный фрагмент исследования был выполнен не только для анализа потенциальных цитогенетических эффектов МЭАВ, а для выяснения возможных механизмов их возникновения. Поэтому в данных экспериментах использовали осмотическую воду, на которой готовили реконструированные среды, а физико-химические параметры вод варьировали в самых широких пределах (табл. 2), причем анализ этих данных не обнаружил связи между показателями хемилюминесценции и электрохимическими показателями воды.

Таблица 2. Характеристика физико-химических свойств образцов
бесконтактно активированной осмотической воды

Наимено- вание воды	Окислитель- но-восстано- ви-тельный затель, рН, потенциал, условные			Светосумма хемилюминесценци и, *10 <sup>4</sup> , условные единицы		Максимум хемилюминесценции, $A_{\scriptscriptstyle M}$ , условные единицы	
H	Eh, мВ	единицы		среднее	вариация	среднее	вариация
Католиты	$-61,7\pm2,3$	$7,20\pm0,02$	$25,1\pm0,00$	1,58	0,04	26,5	0,07
	-39,9±1,6	7,20±0,008	25,1±0,05	2,47	0,11	50,8	0,32
	9,6±5,2	7,07±0,004	25,3±0,05	3,67	0,12	71,3	0,21
	113,7±2,7	$7,00\pm0,04$	22,1±0,05	2,64	0,14	57,4	0,46
	149,2±3,2	6,81±0,01	24,2±0,05	4,25	0,26	74,7	0,24
	206,0±6,7	7,19±0,03	22±0,05	1,72	0,17	31	0,18
K O HT	325,9±7,0	6,70±0,016	23,0±0,05	5,46	0,24	93	0,19
Ано ли- ты	346,39±1,4	6,40±0,01	26,7±0,05	2,85	0,1	51,3	0,11
	360,8±6,9	6,19±0,006	22,2±0,05	1,91	0,1	34,5	0,1

Цитогенетический анализ обнаружил множество цитогенетических эффектов, сопоставление которых оказалось невозможным без понимания механизмов их возникновения. Поэтому результаты данного фрагмента работы мы будем описывать именно с этой позиции. Хорошо известно, что универсальным индикатором биологической активности клеток в культуре является пролиферативная активность. Поскольку ОВП принято считать основным физическим показателем, характеризующим биологическую активность воды, мы

предположили наличие единой закономерности изменения пролиферативной активности клеток от ОВП во всем изученном диапазоне. Однако связь между этими показателями в наших экспериментах оказалась существенно нелинейной (рис. 4): прямая корреляционная связь между ОВП и пролиферативной активностью клеток была обнаружена только для сильных католитов, обратная — только для анолитов, промежуточные значения пролиферативной активности клеток с ОВП не коррелировали, а максимальный пролиферативный пул был

отмечен в контроле, где культура росла на воде, не подвергавшейся активации. В то же время мы наблюдали согласованность динамики люминол-зависимой хемилюминесценции и пролиферативной активности клеток (рис. 5), что позволило предположить присутствие в среде и влияние на пролиферативную активность фактора(ов) радикальной природы.

Анализ химического состава среды RPMI, проведенный по данным литературы, показал, что к таким соединениям относится  $H_2O_2$  [16], чье содержание в изученных образцах воды коррелировало со светосуммой хемилюминесценции на уровне  $\kappa$ =0,98 (p=0,000002). Анализ связи между содержанием  $H_2O_2$  в водах и пролиферативной активностью клеток в культурах, приготовленных из этих вод, показан на рис. 6.

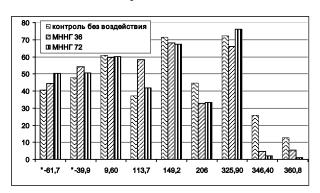


Рис. 4. Изменение пролиферативной активности клеток в зависимости от окислительно-восстановительного потенциала без и в присутствии стандартного мутагена N-нитро-N-метил-N-нитрозогуанидина (МННГ). По оси абсцисс — окислительно-восстановительный потенциал (ОВП), мВ; по оси ординат — делящиеся клетки в спектре, %.

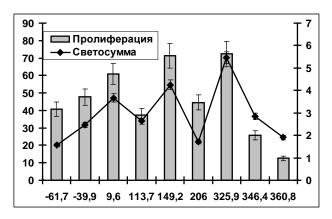
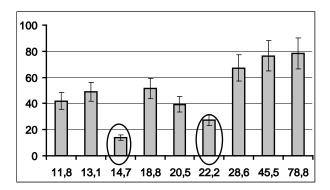


Рис. 5. Связь пролиферативной активности клеток в культуре со светосуммой хемилюминесценции. По оси абсцисс – окислительно-восстановительный потенциал (ОВП), мВ; по оси ординат: слева – делящиеся клетки в спектре (пролиферация), %; справа – светосумма хемилюминесценции, \*10<sup>4</sup>, условные единицы

Как видно на достаточно гладкой кривой зависимости пролиферации клеток от концентрации  $H_2O_2$  в растворе выпадают две точки, причем в обоих случаях соответствующие значения получены в культурах, приготовленных на анолитах. Возвращаясь к рис. 4 и 5, на которых видно, что

эффекты в культурах на анолитах, всегда отличаются от эффектов в культурах на католитах, и, учитывая, что электроноакцепторные свойства анолитов должны оказывать качественно иное влияние на живые клетки, чем электронодонорные католиты, мы пришли к заключению, что биологические эффекты в этих двух типах культур надо всегда рассматривать отдельно.



**Рис. 6.** Изменение пролиферативной активности клеток в культуре в зависимости от содержания перекиси водорода в воде, на которой были приготовлены культуральные среды. Выделены данные по анолитам. По оси абсцисс — концентрация перекиси водорода ( $H_2O_2$ ), мкг/л %; по оси ординат — делящиеся клетки в спектре (пролиферация), %

Хорошо известно, что генетические повреждения, определяемые в микроядерном тесте — микроядра и нуклеоплазменные мосты — формируются только в клетках, прошедших митоз, поэтому вероятность их обнаружения возрастает с увеличением пролиферативной активности клеток. То есть, в клетках, в которых по каким-либо причинам движение по клеточному циклу замедлено или остановлено, имеющиеся повреждения могут остаться недопроявленными. На рис. 7 показаны изменения частоты делящихся клеток с повреждениями и пролиферативная активность клеток в культурах, приготовленных с использованием разных католитах (7A) и анолитах (7Б).

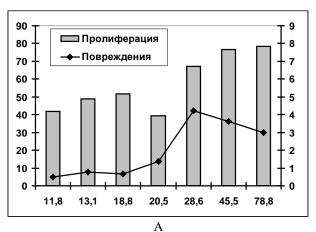
Как видно на этих рисунках, наибольшая пролиферативная активность была обнаружена в контрольной культуре, для приготовления которой использовали воду с максимальной концентрацией перекиси водорода. Со снижением концентрации перекиси водорода в католитах снижалась пролиферативная активность клеток в культурах, приготовленных на этих водах, и, параллельно, снижалась частота клеток с генетическими повреждениями. В анолитах наблюдалась качественно иная картина — с повышением концентрации перекиси водорода в воде увеличивалась пролиферативная активность клеток и повышалась частота клеток с генетическими повреждениями.

Таким образом, результаты анализа генотоксических эффектов в культуре клеток крови человека в присутствии МЭАВ показали, что:

- пролиферативная активность клеток в культурах, приготовленных на основе энергоинформационных вод, была связана с ОВП воды: максимальная пролиферация наблюдалась в культурах,

приготовленных на контрольной воде, а в культурах на основе как анолитных, так и католитных вод пролиферация клеток снижалась относительно контроля в зависимости от ОВП;

- пролиферативная активность лимфоцитов коррелировала со светосуммой хемилюминесценции вод, на которых были приготовлены культуры для роста клеток, причем максимальная пролиферативная активность клеток в культуре наблюдалось при наибольшем значении светосуммы хемилюминесценции, которое было отмечено в контрольной воде;
- наилучшее соотношение пролиферации (max) и генетических повреждений (min) наблюдалось в культурах клеток, приготовленных на контрольной воде, а в культурах, приготовленных на энергоинформационных водах, на фоне снижения пролиферации клеток наблюдалось увеличение уровня генетических повреждений относительно контроля; наиболее ярко эти эффекты были выражены для культур, приготовленных на анолитных водах.



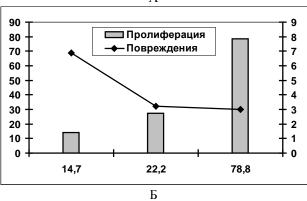


Рис. 7. Изменение пролиферативной активности и частоты клеток с повреждениями в зависимости от концентрации перекиси водорода в воде, на которой приготовлена среда для культивирования клеток. По оси абсцисс — концентрация перекиси водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), мкг/л; по оси ординат: слева — делящиеся клетки в спектре (пролиферация), %;справа — делящиеся клетки с повреждениями в спектре (повреждения), %

Влияние перекиси водорода на возникновение генетических повреждений в МЭАВ оказалось весьма существенным, однако в водопроводной воде по нормативу [17] допускается присутствие до 100 мкг/мл этого вещества (для сравнения в

наших экспериментах самая высокая концентрация  $H_2O_2$  составляла  $80\,$  мкг/л, и в ее присутствии наблюдался самый высокий уровень генетических повреждений). Можно предположить, что снижение концентрации  $H_2O_2$  (как показали наши расчеты [16]) до 20мкг/л будет способствовать значительному улучшению качества не только МЭАВ, но и водопроводных вод. Однако получение вод с низком содержанием перекиси водорода требует новых технологических решений.

### Выводы:

- 1. Питьевые воды с измененными физикохимическими параметрами, полученные мембранной электрохимической активацией, индуцируют эффекты нестабильности генома на биологических объектах разного уровня – от дрозофилы до клеток крови человека.
- 2. Полученные данные доказывают необходимость создания системы оценки генетической безопасности МЭАВ.
- 3. живые тест-объекты, использованные в данной работе, могут быть использованы как тест-объекты в системе оценки генетической безопасности питьевых вод, полученных мембранной электрохимической активацией.
- 4. Снижение генотоксических эффектов питьевых вод, полученных бесконтактной электрохимической активацией, можно достичь путем:
- а) снижения концентрации перекиси водорода в исходной воде либо при использовании специальных схем применения этих вод (снижением водопотребления, использованием дробных схем и прочее), что, тем не менее, также нуждается в оценке генетической безопасности;
- б) уменьшения окислительно-восстановитель-ного потенциала.

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

- . Савостикова, О.Н. Гигиеническая оценка влияния структурных изменений в воде на ее физико-химические и биологические свойства кандидат медицинских наук. Дисс. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук. М., 2008. 160 с.
- Лобышев, В.И. Вода как сенсор слабых воздействий физической и химической природы // Российский химический журнал. 2007. Т. LI, №1. С. 107-114.
- 3. *Рахманин, Ю.А.* Структурно-энергетические изменения воды и ее биологическая активность / *Ю.А. Рахманин, А.А. Стехин, Г.В. Яковлева* // Гигиена и санитария. 2007.№5. С. 34-36.
- Shirahata, S. Anti-oxidative water improves diabetes. In E. Lindner-Olsson, et al. (Eds.) / S. Shirahata, T. Nishimura, S. Kabayama et al. // Animal cell technology. 2001. P. 574-577.
- Osada, K. Anti-diabetes effects of Hita Tenryosui water, a natural reduced water. In K. Ikura, et al. (Eds.) / K. Osada, Y.-P. Li, T. Hamasaki et al. // Animal cell technology: Basic & applied aspects. 2010. V. 15. P. 307-313.
- 6. Бахир, В.М. Электрохимическая активация: очистка воды и получение полезных растворов / В.М. Бахир, Ю.Г. Задорожний, Б.И. Леонов и др. М: ВНИИИМТ, МСС, 2001. 176 с.

- Abe, M. Suppressive effect of ERW on lipid peroxidaton and plasma triglyceride level. In M. Kamihira, et al. (Eds.) / M. Abe, S. Sato, K. Toh et al. // Animal cell technology: Basic & applied aspects. 2010. V. 16. P. 315-321.
- 8. Abo-Enein, H. Ionized alkaline water: new strategy for management of metabolic acidosis in experimental animals / H. Abo-Enein, O.A. Gheith, N. Barakat et al. // Therapeutic Apheresis and Dialysis. 2009. V. 13. P. 220-224.
- Аксенов. С.И. Вода и ее роль в регуляции биологических процессов. – М.-Ижевск, Институт компьютерных исследований, 2004. 212 с.
- Мендельсон, Г.И. Доминантные летальные мутации у различных видов дрозофилы как тест для оценки мутагенного действия загрязнителей окружающей среды: Автореф. дис. канд. биол. наук. М., 1992. 24 с
- Юрченко, В.В. Применение микроядерного теста для оценки питьевых вод / В.В. Юрченко, Е.К. Кривцова, Н.Н. Беляева и др. // Гигиена и санитария. 2008. № 6. С. 49-53.
- Fenech, M. The in vitro micronuclei test technique // Mutation Research. 2000. Vol. 455. P. 81-95.
- 13. *Ингель, Ф.И.* Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека,

- культивируемых в условиях цитокинетического блока. Часть 1. Пролиферация клеток // Экологическая генетика. 2006. Т. IV. № 3. С. 7-19.
- 14. Ингель Ф.И. Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока. Часть 2. Факторы среды и индивидуальные особенности в системе нестабильности генома человека. Дополнительные возможности теста. Методика проведения экспериментов и цитогенетического анализа // Экологическая генетика. 2006. Т. IV. № 4. С. 38-54.
- Smith, L.E. Radiation-induced genomic instability: radiation quality and dose response / L.E. Smith, S. Nagar, G.J. Kim, W.F. Morgan // Health Phys. 2003. V. 85, № 1. P. 23-29.
- 16. Зацепина, О.В. Влияние физически активированной воды на пролиферативную активность и апоптоз лимфоцитов крови человека in vitro / О.В. Зацепина, Ф.И. Ингель, А.А, Стехин, Г.В. Яковлева // Биозащита и биобезопасность. 2013. №3. С. 19-26.
- СанПиН 2.1.4.1074-01 Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения (с изменениями от 7 апреля 2009 г., 25 февраля, 28 июня 2010 г.).

# CHANGE OF PHYSICAL AND CHEMICAL PARAMETERS OF DRINKING WATER BY MEMBRANE ELECTROCHEMICAL ACTIVATION INVOLVES EMERGENCE THE EFFECTS OF GENOME INSTABILITY IN VITRO AND IN VIVO

© 2013 O.V. Zatsepina<sup>1</sup>, F.I. Ingel<sup>2</sup>, A.A. Stekhin<sup>2</sup>, G.V. Yakovleva<sup>2</sup>, O.N. Savostikova<sup>2</sup>, A.V. Alekseeva<sup>2</sup>, T.I. Iksanova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>JSC "Chistaya voda", Samara <sup>2</sup> Scientific Research Institutes of Human Ecology and Environmental Hygiene named after A.N. Sysin, Moscow

In article are given results of studying the genotoxical effects of drinking waters with changed physical and chemical properties on the main genetical-toxicological characteristics of various biological models: human blood cells in culture, sexual cells of drosophila males and mice marrow cells in dynamics of subchronic experiment.

Key words: electrochemical activation of water, effects of genome instability in vitro and in vivo

Olga Zatsepina, Head of the Laboratory Testing Center. E-mail: zatsepinaolga@mail.ru

Faina Ingel, Doctor of Biology, Leading Research Fellow at the Laboratory of Genetics Monitoring

Anatoliy Stekhin, Candidate of Technical Sciences, Chief of the Laboratory of Methodology for Health-Improving Technologies and Environmental Medicine

Galina Yakovleva, Candidate of Technical Sciences, Leading Research Fellow at the Laboratory of Methodology for Health-Improving Technologies and Environmental Medicine Olga Savostikova, Candidate of Medicine, Senior Research Fellow at the Laboratory of Drinking Water Supply Hygiene Anna Alekseeva, Leading research Fellow at the Laboratory of Drinking Water Supply Hygiene Tatiana Iksanova, Minor Research Fellow at the Laboratory of

Tatiana Iksanova, Minor Research Fellow at the Laboratory of Drinking Water Supply Hygiene