

Зацепина Ольга Валерьевна

**ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПИТЬЕВЫХ ВОД,
ПОЛУЧЕННЫХ НЕКОНТАКТНОЙ
ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИЕЙ**

14.02.01 – Гигиена

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им. А. Н. Сысина» Министерства здравоохранения Российской Федерации и в НИИ гигиены и экологии человека при Самарском государственном медицинском университете

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

доктор биологических наук

Ингель Фаина Исааковна

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник Института водных проблем РАН

Эльпинер Леонид Исаакович

Кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории фармакологии мутагенеза ФГБНУ "НИИ фармакологии им. В.В. Закусова"

Жанатаев Алий Курманович

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Смоленская государственная медицинская академия» Минздрава России

Защита в режиме online состоится 11 июня 2015 на заседании Диссертационного совета ДС.001.009.01 при ФГБУ "НИИ ЭЧиГОС им. А.Н.Сысина" Минздрава России по адресу: 119992, Москва, ул. Погодинская, д.10, стр.1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ "НИИ ЭЧиГОС им. А.Н.Сысина" Минздрава России и на сайте: www.sysin.ru

Автореферат разослан « _____ » _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного Совета

доктор биологических наук

Ингель Фаина Исааковна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Проблема качества питьевой воды на современном этапе развития цивилизации является ключевой, поскольку непосредственно связана с состоянием здоровья как ныне живущих, так и будущих поколений людей. Известно, что качество питьевой воды определяется не только ее химическим составом, содержанием микрофлоры, но и физико-химическими свойствами (Рахманин Ю.А., Кондратов В.К., 2002; Рахманин Ю.А., Стехин А.А., Яковлева Г.А., 2007; Савостикова О.Н., 2008). Поэтому в настоящее время широкое распространение получили разнообразные технологии водоподготовки, в результате которых физико-химические свойства питьевой воды заметно изменяются. Анализ литературы показал, что примерно в 80% случаев это электрохимическая активация путем электролиза, приборы для которой производятся как в России, так и в других странах, широко рекламируются и рекомендуются для использования населением. Имеется большое количество публикаций, описывающих положительные результаты применения активированных вод непосредственно для лечения широкого спектра серьезных заболеваний у человека, таких как диабет, болезни кожи и органов желудочно-кишечного тракта, ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь, стенокардия, онкологические заболевания (Бахир В.М. и др, 2001; Широносков В.Г и др, 2008; Shirahata et al, 2001; Abo-Enein et al, 2009; Osada et al, 2010). В то же время экспериментальных исследований биологических эффектов электрохимически активированных питьевых вод явно недостаточно для разрешения широкого использования населением: в доступной литературе удалось найти только данные, полученные на растениях и гидробионтах различных трофических уровней (Рахманин, Ю. А. Стехин А. А., Яковлева Г. В., 2007; Савостикова О.Н., 2008), а также публикации последнего времени по результатам исследований на животных (Сычева Л.П. и др, 2014; Беляева Н.Н. и др., 2015), вышедшие в печать, когда собственные данные уже были опубликованы.

Известно, что при контактной электрохимической активации в воду попадают ионы тяжелых металлов, источником которых является материал электродов, а также ионы, образующиеся при разложении воды и присутствующих в ней солей и продукты их последующего окисления или восстановления (Хачатрян А.П., Спиридонов А.Н., 2002). Поэтому для улучшения качества активированной питьевой воды было предложено использовать неконтактную электрохимическую активацию (НА), когда питьевая вода в тонкостенном полиэтиленовом пакете погружается в емкость с контактно электрохимически активированной водой. В результате происходит изменение физических параметров воды, находящейся в пакете без изменения ее химического состава, что позволяет считать такую воду более безопасной, чем полученную в контактных электролизерах (Казанкин Д.С., Широносков В.Г., 2001).

Вопрос об оценке безопасности неконтактно электрохимически активированных вод ранее не поднимался: считалось, что если - в соответствии с регламентами применения электрохимических активаторов питьевой воды - в прибор поступает вода, удовлетворяющая условиям СанПиН по химическому составу, то после активации вода также должна соответствовать этим условиям.

Однако известно, что в процессе неконтактной электрохимической активации в воде изменяются окислительно-восстановительный потенциал (ОВП), доля связанной (структурированной) фазы (СФ) и другие физико-химические свойства (Лобышев В.И., 2007; Стехин А.А. и др, 2008), что оказывает влияние на процессы формирования, стабилизации и

функционирования клеточных мембран, белков и ДНК (Аксенов С.И., 2004; Лобышев В.И., 2007). Эти данные позволяют предположить у неконтактно активированных вод (НАВ) возможность проявления генотоксической активности, что выводит на передний план гигиенических исследований экспериментальную оценку безопасности НАВ, и – в особенности – анализ отдаленных (в том числе, генотоксических) эффектов. Бесконтрольная продажа и пропаганда использования в быту приборов для электрохимической активации питьевых вод делает проблему оценки безопасности этих вод – в том числе, генотоксических эффектов – особенно актуальной.

Исходя из этого, **целью работы** является оценка генетической безопасности питьевых вод, полученных неконтактной (электрохимической) активацией, и создание минимального набора тестов для проведения рутинных исследований активированных вод на наличие генотоксической активности.

Для достижения этой цели требовалось решить следующие **задачи**:

1. На живых объектах, находящихся на разных уровнях организации живого (бактериях, дрозофиле, мышах *in vivo* и культивируемых клетках крови человека), оценить потенциальные генотоксические эффекты НАВ, приготовленных на основе различных питьевых вод.

2. Определить физико-химические параметры электрохимически активированных вод, существенные для обеспечения генетической безопасности.

3. По материалам исследований разработать методику оценки потенциальной генотоксичности активированных питьевых вод.

Научная новизна:

- впервые показано, что неконтактно активированные католиты и анолиты, приготовленные на основе вод с разной минерализацией - артезианской воды, очищенной обратным осмосом, московской водопроводной воды и бутилированной питьевой воды «Пилигрим», индуцировали генотоксические эффекты в половых клетках *Drosophila melanogaster*, на клетках крови человека, культивированных в условиях цитокинетического блока и клетках костного мозга мышей *in vivo*, хотя дозовые зависимости от продолжительности активации, а также от ОВП НАВ обнаружены не были; разные воды, также как и воды из одного источника, неконтактно активированные в одинаковых условиях в разное время, могут обладать различными физико-химическими свойствами и разной биологической активностью;

- впервые продемонстрировано, что характерная для действия радиации и химических мутагенов отрицательная корреляционная связь между пролиферативной активностью и частотой клеток с цитогенетическими повреждениями (как в динамике подострого эксперимента на мышах, так и при культивировании клеток крови в реконструированных средах на НАВ, приготовленных на основе всех изученных питьевых вод), проявлялась только для анолитов, в то время как для католитов эта связь была прямой, описанной для канцерогенов;

- впервые установлено, что генотоксические эффекты, индуцированные неконтактно активированными католитами и анолитами, полученными одной и той же питьевой воды, принципиально различались по ассоциации с физико-химическими свойствами НАВ: католиты - со светосуммой люминол-геминовой хемилюминесценции воды (СХЛ), а анолиты – со значениями ОВП и рН активированных вод;

- впервые установлено, что пролиферативная активность в лимфоцитах крови человека,

культивированных в реконструированных средах на основе вод, полученных продолжительной неконтактной активацией, уменьшается с уменьшением минерализации исходных (неактивированных) вод. То есть, в процессе неконтактной активации происходит трансформация компонентов минерального состава вод с образованием соединений, которые стимулируют клетки к делению.

- в результате проведенных экспериментов обоснована необходимость гигиенической регламентации условий применения приборов для неконтактной активации воды на основании оценки потенциальной генетической опасности НАВ и разработан набор краткосрочных тестов, пригодный для ее определения.

Методическая новизна

1. Для оценки генетической безопасности питьевых вод, полученных неконтактной электрохимической активацией, выделены наиболее информативные тест-объекты: клетки крови человека, культивированные в условиях цитокинетического блока с цитогенетическим анализом в расширенном варианте микроядерного теста, и клетки костного мозга мышей с цитогенетическим анализом в тесте на индукцию хромосомных aberrаций.

2. По результатам исследования разработан алгоритм оценки потенциальной генетической опасности питьевых вод, полученных неконтактной электрохимической активацией.

3. Для скрининга безопасных активированных вод адекватен микроядерный тест на клетках крови человека, культивированных в условиях цитокинетического блока, на качественном уровне дающий удовлетворительный прогноз индукции мутаций и изменения пролиферативной активности в тесте на индукцию хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей *in vivo*.

Практическая значимость полученных результатов и формы внедрения в практику:

- показано, что питьевые воды, полученные неконтактной электрохимической активацией, не могут быть рекомендованы к применению населением без предварительной оценки отдаленных последствий их потребления в системе краткосрочных тестов; для скрининга безопасности НАВ в качестве экспресс-метода рекомендуется тест на культуре клеток крови человека;

- при выдаче разрешительной документации на приборы для электрохимической активации питьевых вод с целью обеспечения генетической безопасности населения следует изучать потенциальные генотоксические эффекты вод, полученных на этих приборах;

- для решения задач генетико-токсикологического скрининга предложен алгоритм и методы определения генетической безопасности питьевых вод, полученных неконтактной (электрохимической) активацией, что создает экспериментальную базу для определения риска развития генотоксических эффектов у потребителей активированной воды в быту и может быть использовано при выборе безопасных приборов и условий получения НАВ;

- по материалам исследования разработаны и утверждены Председателем Проблемной комиссии Межведомственного Научного совета по экологии человека и гигиене окружающей среды академиком РАН Ю.А.Рахманиным методические рекомендации по оценке генетической безопасности питьевых вод, полученных неконтактной электрохимической активацией.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В процессе неконтактной (электрохимической) активации питьевые воды могут приобретать в разной степени выраженную генотоксическую активность, которая выявляется

на стандартных живых тест-объектах, рекомендованных в РФ, странах ЕС, США и др. для идентификации генетической опасности;

2. Католиты и анолиты, полученные в результате неконтактной активации из одной и той же воды, различаются качественно по влиянию на пролиферативную и митотическую активность клеток *in vitro* и *in vivo*, а также по типу связи между показателями пролиферации клеток и частотами их генетических повреждений: эффекты католитов ассоциированы со светосуммой гемин-зависимой хемилюминесценции, а анолитов – с ОВП и рН НАВ.

3. Изменение доли связанной фазы воды в процессе неконтактной электрохимической активации влияет на проявление у нее генотоксической активности.

4. Предложенный минимальный блок тестов и алгоритм проведения исследований (объекты, схемы и условия проведения экспериментов) адекватны для оценки генетической безопасности НАВ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 работ, в том числе, 3 - в изданиях, включенных в перечень ВАК, и 1 в зарубежной печати.

Работа выполнена в лабораториях генетического мониторинга, методологии оздоровительных технологий и медицины окружающей среды, а также лаборатории гигиены питьевого водоснабжения и санитарной охраны водоемов ФГБУ «НИИ ЭЧиГОС им А.Н.Сысина» МЗ РФ в рамках Государственных заданий ФГБУ «НИИ ЭЧ и ГОС им. А.Н.Сысина» Минздрава России: раздел 2 «Выполнение фундаментальных научных исследований» «Исследования закономерностей в системе "структура-активность"» (Исследование закономерностей регулируемой структурно-энергетической самоорганизации фазы ассоциированной воды для формирования питьевых вод с направленным биологическим действием). № гос. регистрации 140319123146; раздел 5 «Организационное и информационное обеспечение деятельности в области здравоохранения и социально-трудовой сферы» «Внедрение рекомендаций и решений ОЭСР в части химических веществ» № гос. регистрации 01201461959 плановой темы «Исследование закономерностей регулируемой структурно-энергетической самоорганизации фазоассоциированной воды для формирования питьевых вод с направленным биологическим действием» (рег.№ 01201461961). Часть исследований выполнена в НИИ гигиены и экологии человека при Самарском государственном медицинском университете.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 161 страницы компьютерного текста, содержит 44 таблицы, 31 рисунок, и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов исследования, 5 глав, описывающих результаты собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, списка литературы, содержащего 121 отечественных и 61 иностранных источника, 3 приложений на 75 страницах.

Апробация работы. Результаты исследования доложены и обсуждены на: 8-м международном симпозиуме «Экология человека и медико-биологическая безопасность населения», Венгрия-Австрия, 20-29 октября 2012; Международном водном форуме Экватор 2012 «Вода, экология и технология» (секция «Энергоинформационные технологии»), Москва, 5-6 августа 2012; XVIII-м Всероссийском конгрессе «Экология и здоровье человека», Самара, 8-10 октября 2013; IV-м съезде токсикологов России, Москва, 6–8 ноября 2013; VIII Всероссийском форуме «Здоровье нации – основа процветания России», Москва, 18-20 июня 2014; пленумах Научного совета по экологии человека и гигиене окружающей среды РФ

«Актуализированные проблемы здоровья человека и среды обитания и пути их решения» 12-13 декабря 2012 и «Приоритеты профилактического здравоохранения в устойчивом развитии общества: состояние и пути решения проблем», Москва, 12-13 декабря 2013; IV-й Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье. Молодые ученые за устойчивое развитие страны в глобальном мире», 27-28 сентября 2012, Москва; 42th Annual Meeting of European Environmental Mutagenic Society (EEMS), Poland, Warsaw, 16-21 Sept 2012; Conference on the Physics, Chemistry and Biology of Water, 22-25 of October 2013, Bulgaria.

Личный вклад автора составляет не менее 80% и заключается в участии в работе на всех этапах ее проведения: подборе и анализе имеющейся литературы, выборе цели и постановке задач работы, планировании, проведении и анализе результатов экспериментов, измерении основных физико-химических показателей НАВ, статистической обработке данных, написании тезисов, статей, текста диссертации и автореферата. Часть исследований проведена совместно с сотрудниками лаборатории генетического мониторинга, лаборатории методологии оздоровительных технологий и медицины окружающей среды и лаборатории питьевого водоснабжения ФГБУ «НИИ ЭЧ и ГОС им. А.Н. Сысина» Минздрава России.

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методологической основой исследования являлась оценка потенциальной генотоксичности различных НАВ на культивируемых в условиях цитокинетического блока клетках крови человека, клетках костного мозга мышей *in vivo* и половых клетках самцов *Drosophila melanogaster*. Выбор тестов, тест-объектов и дизайна исследования для оценки потенциальной генотоксичности НАВ проводили в соответствии с Test Guideline OECD 487. *In vitro* mammalian cell micronucleus test, OECD, Paris, 2010; Test Guideline OECD 475. Mammalian bone marrow chromosome aberration test. Paris, 1997; МР «Система оценки нестабильности генома человека в генетико-гигиенических исследованиях» М., 2004, «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств», МЗ РФ, ФГБУ "Научный центр экспертизы средств медицинского применения", М.2012 и Руководством по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. Гигиенические критерии состояния окружающей среды 51. ВОЗ, Женева, 1989.

Для получения НАВ использовали: 1) артезианскую воду из скважины №1199 (ЗАО «Чистая вода» г.Самара (эта вода служит основой для производства питьевой воды "Кристалльная" ТУ 0131-002-43869381-11 "Вода питьевая "Кристалльная" и СанПиН 2.1.4.1116-02 "Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества"), 2) московскую водопроводную воду, воду из водопровода г.Самары, и 3) - минеральную столовую негазированную бутилированную воду «Пилигрим» (ООО «Меркурий». ТУ 9185-008-02701706-05 "Вода минеральная питьевая столовая "Пилигрим" и ГОСТ Р 54316-2011 "Воды минеральные природные питьевые. Общие технические условия").

Перед активацией артезианскую воду очищали на установке обратного осмоса, 15 мин стерилизовали кипячением в стеклянной посуде и отстаивали в течение суток. Московскую водопроводную воду и воду из водопровода г.Самары пропускали через систему фильтров грубой и тонкой очистки, кипятили, и отстаивали 24 час. Бутилированную воду «Пилигрим» стерилизовали пропусканием через одноразовые мембранные фильтры «GE Infrastructure Water & Process Technologies Life Science Microseparations PES» с диаметром пор 0,22 мкм.

Контактную активацию проводили на модифицированном электрохимическом активаторе «Изумруд» (СЭЗ №77.99.34.485.Д.010314.06.10 от 29.06 2010) или активаторе АП-2 с параметрами активации $U = 20-60$ мВ. Для проведения неконтактной активации воды, подготовленные как описано выше, наливали в стерильные полиэтиленовые герметично закрывающиеся пакеты объемом 500 мл (Nasco WHIRL-PAK, USA, толщина стенок 120 мкм) и помещали в емкости, в каждой из которых находились катодит или анолит, полученные контактной электрохимической активацией. Для получения НАВ воду в пакетах выдерживали в течение 5-60 мин или 24 час.

Физико-химические параметры исходных и активированных вод (рН, ОВП, электропроводность, светосумму люминол-геминовой хемилюминесценции и долю связанной фазы, табл.2) определяли на поверенном оборудовании в соответствии с существующими рекомендациями.

В качестве тест-объектов использовали самцов мышей F1 (СВА х С57Bl/6j, питомник «Столбовая», группы по 6 животных); цельную венозную кровь молодых здоровых некурящих доноров; мух вида *Drosophila melanogaster* линии Д-32 разводки ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова» РАН (линию поддерживали в ФГБУ «НИИ ЭЧиГОС им А.Н.Сысина» МЗ РФ); музейный штамм *E.coli* 1257 из коллекции государственного НИИ стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им Л.А.Тарасевича и штамм *V.Cereus* IP 5832, выделенный из аптечного препарата «Бактисубтил».

Объем проведенных исследований показан в табл. 1.

Таблица 1 – Объем проведенных исследований

Изучены биологические эффекты	66 образцов воды
Измерений физико-химических параметров	более 280
Количественный химический анализ состава московской водопроводной воды и активированных вод, полученных на ее основе	13 образцов воды на основе московской водопроводной
В микроядерном тесте на культуре клеток крови человека по 33 показателям проанализировано	19 образцов воды на основе московской водопроводной, осмотической и бутилированной воды «Пилигрим»; более 42 000 клеток
В тесте на индукцию доминантных летальных мутаций в половых клетках самцов дрозофилы проанализировано	5 образцов воды на основе московской водопроводной, более 6 000 яиц дрозофилы
В тесте на индукцию хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей проанализировано: - метафазных пластинок - ядер для определения митотического индекса	5 образцов воды на основе московской водопроводной, более 10000 более 130000
Микробиологические эксперименты проведены на <i>E.Coli</i> 1257 (лиофилизированный штамм) и <i>V.Cereus</i> IP 5832	24 образца воды на основе осмотической и водопроводной воды г.Самара, 540 определений
Всего проанализировано	более 188 000 единиц информации

Во всех экспериментах в качестве контроля использовали исходные неактивированные воды. Все пробы воды, образцы биоматериалов и цитогенетические препараты перед анализом шифровали с расшифровкой после проведения всех анализов. Основные физико-химические показатели изученных вод показаны в табл.2.

Таблица 2. Диапазон варьирования физико-химических свойств изученных образцов НАВ.

НАВ	Режим неконтактной активации	Окислительно-восстановительный потенциал, мВ	Водородный показатель, усл.ед.	Электропроводность, мкСм/см	Светосумма хемилюминесценции $\times 10^3$, усл.ед.	Доля связанной (структурированной) фазы, %
Контроль	нет	191,7...356,0	6,7...7,8	13,01-391,5	0,14...73,3	0,088-0,269
Католиты	20-60 мА, 5 мин – 24 час	- 62,9...275,3	6,6...7,8	11,7...385,5	0,12...89,5	0,124-0,326
Анолиты	60 мА, 30 мин–24 час	224,4...360,8	6,19...7,35	22,2...390,5	0,98...72,9	0,11-0,429

Содержание органических соединений в московской водопроводной воде и активированных вод на ее основе выполнены на - хромато-масс-спектрометре Focus GC с DSQ II (США) (Свидетельство о поверке № 5345-10 от 08.07.2010 г.) в соответствии с ГОСТ Р ИСО 16000-6-2007. Содержание анионов определяли методами ионной хроматографии в соответствии с ГОСТ 31867-2012, катионов – по ГОСТ 31869-2012. Измерения выполнены в лаборатории физико-химических исследований НИИ ЭЧиГОС им. А.Н Сысина (рук. проф. А. Г. Малышева).

Для оценки бактерицидного действия НАВ культуру *E.coli* восстанавливали из лиофилизированного состояния с помощью питательного бульона и пересеивали на среду ЭНДО. Одну типичную колонию (идентифицированную по отпечатку на среде ЭНДО и характерному металлическому блеску) пересеивали на скошенный питательный агар для получения рабочей культуры. Разведение до 10^5 готовили в физиологическом растворе при соотношении со стандартным образцом мутности. Дальнейшее разведение (10^4 - 10^2 клеток в 1 мл) готовили в мембранно-электрохимически обработанной осмотической и водопроводной водах (г.Самара). Культуры в течение 2 и 24 часов выдерживали при 37°C и высевали на 2 параллельные чашки Петри с неселективным питательным агаром, на которых подсчет выросших типичных колоний проводили через 24 часа инкубации при 37°C . Культуру *B.Cereus* восстанавливали из капсул аптечного препарата «Бактисубтил» на питательном бульоне и пересеивали на питательный агар для получения изолированных колоний. Далее эксперименты проводили, как описано для *E.coli*.

Для оценки влияния НАВ на индукцию доминантных летальных мутаций в половых клетках *Drosophila melanogaster* молодых самцов мух (50 особей в группе) в течение 48 час выпаивали 5% растворами сахарозы, приготовленными на НАВ на основе московской водопроводной воды, которую готовили и сменяли каждые 24 часа. Затем самцов массово скрещивали с девственными самками той же линии, после чего самок для откладки яиц помещали в специальные домики, дном которых служили кюветы с кормом. Кюветы сменяли каждые 12 часов, на них подсчитывали количество отложенных яиц и оставляли во влажных камерах при 24°C на 36 час, после чего в каждой кювете подсчитывали количество неразвившихся яиц.

Яйца, не изменившие своего первоначального вида, идентифицировали как ранние эмбриональные летали (РЭЛ), а яйца, имевшие желтую окраску всех оттенков – как поздние эмбриональные летали (ПЭЛ) (ВОЗ, 1999; Гончарук В.В., 2014).

Для оценки влияния НАВ на показатели нестабильности генома человека клетки цельной венозной крови практически здоровых некурящих молодых доноров культивировали в условиях цитокинетического блока на реконструированных средах, которые готовили *ex tempore* разведением сухой стерильной среды RPMI-1640 (ПанЭко, РФ) в стерильных образцах изучаемых НАВ. На каждый образец воды ставили 1-3 культуры. В качестве дополнительного контроля использовали стандартную жидкую среду RPMI 1640 (ПанЭко, РФ). Для анализа изменения чувствительности генома под действием НАВ на 24 часу в параллельные культуры вводили стандартный мутаген прямого действия N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин (МННГ, Aldrich, США) до конечных концентраций 3,0 и 6,0 мкг/мл. Цитохалазин В (ЦХВ, ПанЭко, РФ) вводили в культуры на 44 часу, клетки фиксировали на 72 часу. Препараты окрашивали азур-эозином по Гимзе-Романовскому (Роскин Г.И., 1957). При проведении цитогенетического анализа определяли частоты двуядерных клеток с микроядрами (МЯ) и нуклеоплазменными мостами (Fenech M. et al, 2000, 2003). Дополнительно определяли частоту генетических повреждений во всех делящихся клетках, пролиферативную активность, спектр делящихся клеток, асимметрию деления клеток во втором митотическом цикле, частоты митоза и апоптоза. Всего на каждом препарате определяли 33 показателя (Ингель Ф.И. и др, 2006).

Для оценки влияния НАВ на индукцию хромосомных aberrаций в клетках костного мозга самцов мышей в течение 30 суток *ad libitum* выпаивали католитами и анолитом, приготовленными на основе московской водопроводной воды. НАВ готовили и разливали в поилки 1 раз в сутки. Объем потребляемой воды фиксировали ежедневно. Эвтаназию животных цервикальной дислокацией за сутки до начала эксперимента, через сутки после его начала и далее на 8, 15 и 30 сутки. Препараты клеток костного мозга для метафазного анализа готовили стандартным способом. На каждом препарате анализировали 100 метафазных пластинок с хорошим разбросом хромосом и модальным числом 40 ± 2 . Учитывали одиночные и парные фрагменты, а также обмены. Кроме того, на каждом препарате при анализе 1000 ядер определяли митотический индекс. Частоты ахроматических пробелов (гепов) учитывали отдельно и не включали в число aberrаций хромосом.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартного пакета компьютерных программ Statistica 10.0 STATSOFT. Для сравнения опытных и контрольных серий применяли критерии χ^2 и Манна-Уитни, для анализа дозовых зависимостей использовали регрессионный анализ; для анализа связи генотоксических эффектов с физико-химическими свойствами НАВ проводили корреляционный анализ по критерию Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исключения влияния солевого состава на потенциальную генотоксическую активность НАВ на первом этапе работы изучали эффекты осмотической воды *in vitro*.

На рис.1 показаны результаты анализа пролиферативной активности культивированных в реконструированных средах клеток крови человека. Как видно, в средах на всех НАВ наблюдалось торможение пролиферации клеток, что, преимущественно, выражалось в увеличении доли неделящихся (однойядерных) клеток и в снижении доли ускоренно делящихся (содержавших более 2 ядер) клеток в спектре клеточных популяций. Степень выраженности эффекта линейно зависела от напряжения на электродах при электролизе (особенно при

часовой экспозиции), но не от ОВП.

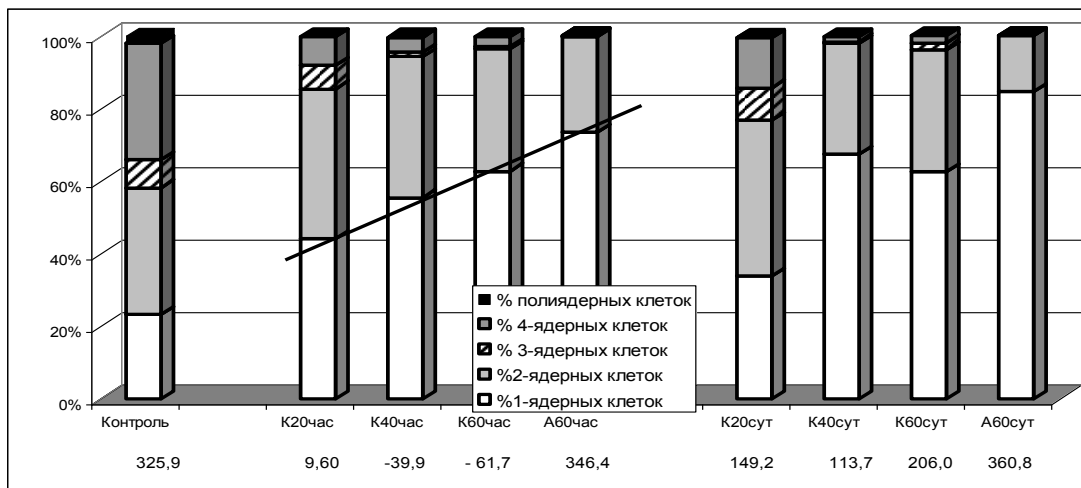


Рисунок 1. Изменение спектра клеточных популяций в культурах крови человека, культивированных в средах на осмотической воде в зависимости от режима активации.

Нижняя шкала абсцисс – ОВП (мВ)

Обозначения: К - католиты, А – анолиты; 20,40,60 – сила тока на электродах при получении контактных католитов и анолитов; час, сут - продолжительность активации НАВ

В этих экспериментах суммарная частота клеток с повреждениями (МЯ и НПМ) была значимо выше контроля (ОВП 325,9мВ) только в культуре на анолите (ОВП 360,8 мВ), а в некоторых средах на католитах, наоборот, наблюдалось снижение частоты клеток с МЯ и НПМ (рис.2А).

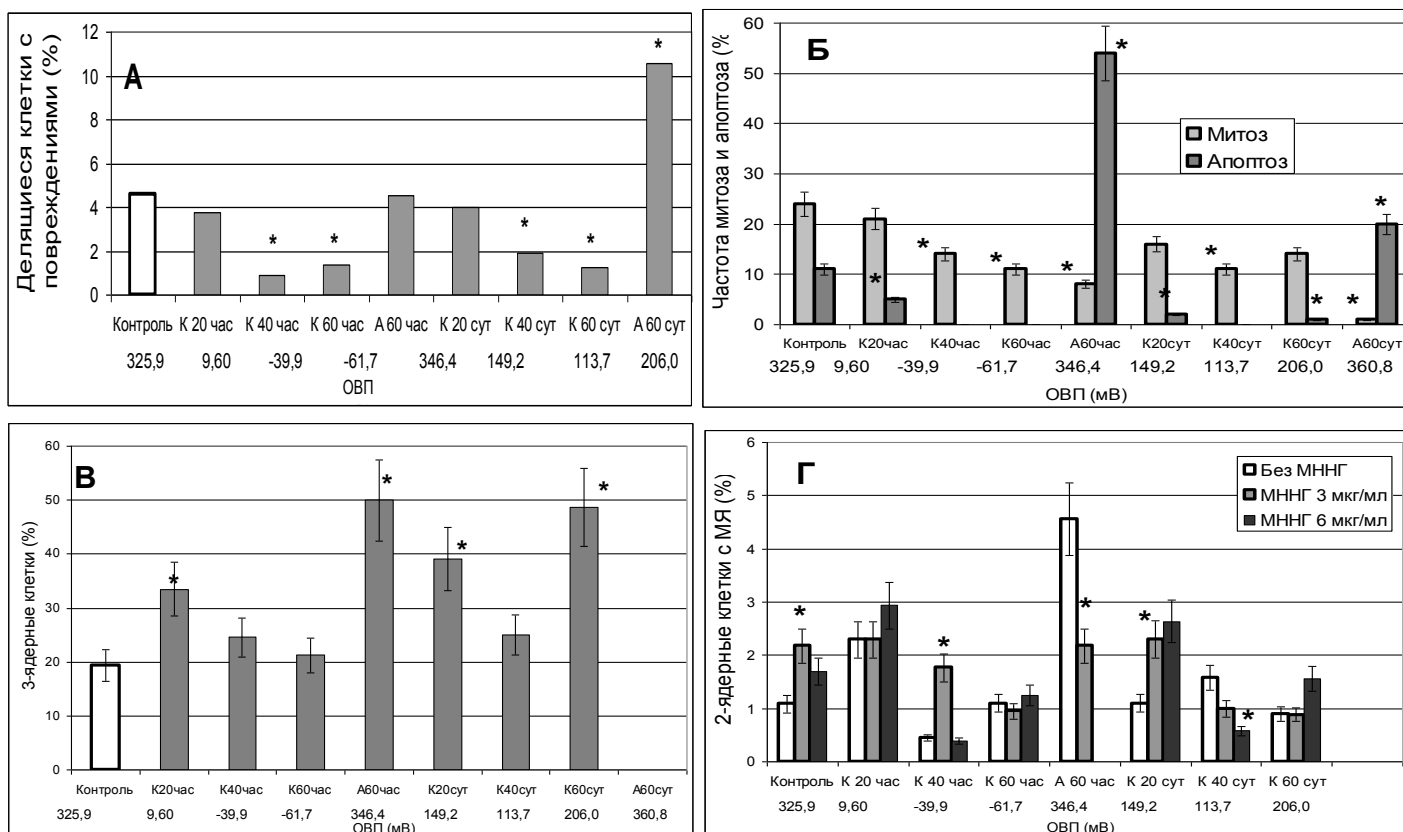


Рисунок 2. Основные эффекты нестабильности генома лимфоцитов крови человека в зависимости от режимов получения и ОВП НАВ: **А** – суммарная частота клеток с МЯ и НПМ (%); **Б** – митотическая активность и частота апоптоза; **В** – доля 3-ядерных клеток среди всех клеток, прошедших в присутствии ЦХВ два митотических цикла; **Г** – частота двуядерных клеток с повреждениями в присутствии МННГ. *Примечание: *) на рисунках А,Б и В - $p \leq 0,05$ относительно контроля; на рис. Г показаны значимые различия с пробами воды, необработанными МННГ.*

Важно, что во всех католитах вне зависимости от значений ОВП доля 3-ядерных клеток, образовавшихся в результате асимметричного распределения генетического материала во втором митотическом цикле, была выше уровня контроля (рис.2В). Нагрузка культур крови человека разными концентрациями стандартного мутагена показала, что активация воды повышала чувствительность генома к действию стандартного мутагена МННГ. Эти эффекты, преимущественно, проявились в повышении частоты 2-ядерных клеток с повреждениями (рис.2Г) и увеличении числа клеток в состоянии апоптоза.

Противоположными для католитов и анолитов оказались и корреляции между основными цитогенетическими показателями – частотой делящихся клеток с генетическими повреждениями и объемом пролиферативного пула (рис.3). Поэтому в дальнейших исследованиях эффекты анолитов и католитов анализировали отдельно.

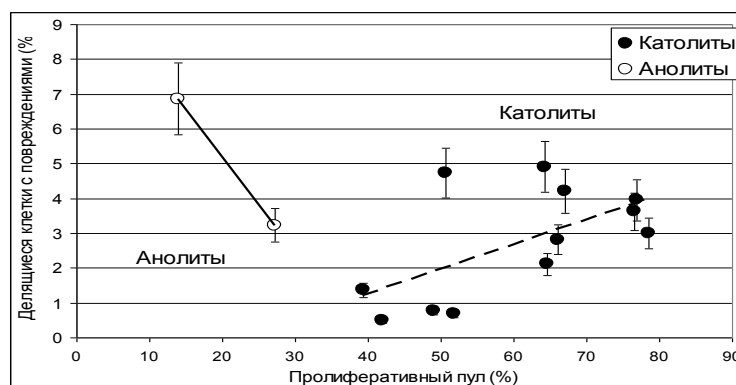


Рисунок 3. Зависимость частоты делящихся клеток с повреждениями от пролиферативного пула при культивировании клеток крови человека в реконструированных средах на НАВ (отдельно для католитов и анолитов).

Таким образом, результаты 1-го этапа исследования выявили наличие генотоксической активности у различных НАВ вне зависимости этих эффектов от ОВП, что потребовало систематического изучения этих вод на живых моделях разного уровня. Для дальнейшего изучения эффектов неконтактной активации представляется целесообразным:

1. Использовать изученный широкий диапазон значений ОВП (от – 60 до +360 мВ);
2. Для получения *неконтактно* активированных католитов эффективна короткая (не более 60 мин) экспозиция в контактно полученных водах, полученных при максимальной силе тока (60 мА);
3. Изучить генотоксические эффекты НАВ на основе водопроводной воды, поскольку именно эта вода наиболее вероятно может использоваться в бытовых активаторах.

Для контактно электрохимически активированных вод неоднократно была описана бактерицидная активность (Леонов Б.И. и др, 1999; Бахир В.М. и др. 2001, Каврук Л.С.и др, 2004; Kiura et al, 2002). Для НАВ такие сведения в литературе отсутствуют, поэтому на следующем этапе работы изучали влияние НАВ на жизнеспособность бактерий кишечной флоры человека. Для работы использовали бактерии с разнонаправленной активностью: музейный штамм E.coli 1257 как модель патогенной микрофлоры и V.sereus IP 5832 из аптечного препарата Бактисубтил.

Результаты экспериментов показали, что для обоих штаммов бактериостатическое

действие нелинейно изменялось при изменении ОВП НАВ, причем этот эффект наблюдался как в осмотической, так и в водопроводной воде. Эти эксперименты выявили существенную нестабильность ОВП воды Самарского водопровода и НАВ на ее основе при постоянных условиях активации в близкие календарные сроки, а также вариабельность жизнеспособности бактерий, инкубированных в этих НАВ (рис.4). Аналогично, существенно нелинейные зависимости были получены при инкубации бактерий в НАВ на основе осмотической воды.

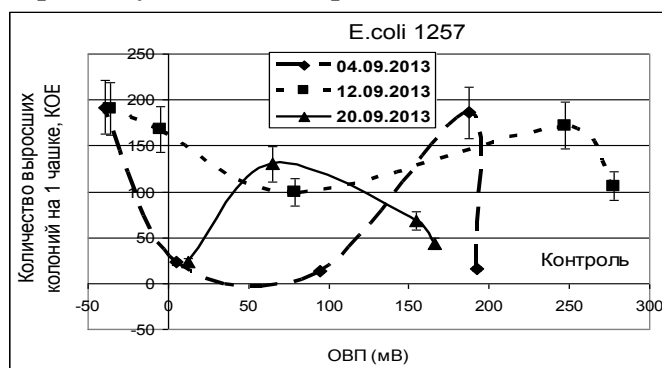


Рисунок 4. Воспроизводимость результатов экспериментов по оценке жизнеспособности E.coli 1257 при 24 часовой инкубации в НАВ на основе воды из самарского водопровода

Таким образом, анализ влияния НАВ на жизнеспособность как патогенных микроорганизмов, так и бактерий, используемых для восстановления кишечной флоры, выявил нелинейные и плохо воспроизводимые как бактериостатические, так и биостимулирующие эффекты для обоих использованных штаммов.

Поскольку для неконтактной активации в быту чаще всего может быть использована водопроводная вода, следующая серия экспериментов была проведена на НАВ на основе воды из московского водопровода.

Одним из наиболее быстрых методов оценки генотоксических эффектов у эукариот является анализ частоты доминантных летальных мутаций в половых клетках дрозофилы, чувствительность которого мало отличается от соответствующего теста на лабораторных грызунах (Худолей В.В., 1986). Опыты на *Drosophila melanogaster* показали (табл.3), что во всех группах, кроме католита, полученного 20 мин экспозицией, количество отложенных яиц на 30-80% превышало уровень контроля. Это напоминает биостимулирующий эффект, ранее

Таблица 3. Влияние неконтактно электрохимически активированных вод на фертильность самцов дрозофилы и частоты доминантных летальных мутаций в половых клетках мух

НАВ, условия активации	ОВП, мВ	Количество отложенных яиц,	Фертильность, % от контроля	Частоты доминантных летальных мутаций, %		Доля в общей частоте мутаций, %	
				РЭЛ	ПЭЛ	РЭЛ	ПЭЛ
Контроль	322,0	776	100	8,38 ± 0,10	0,52 ± 0,10	0,94	0,06
Анолит	275,0	1029	132,60**	8,94 ± 0,10	0,58 ± 0,10	0,94	0,06
5 мин католит	58,8	1425	183,63**	6,67 ± 0,16	0,63 ± 0,16	0,91	0,09
20 мин католит	- 16,6	663	85,44*	3,62 ± 0,20	0,90* ± 0,20	0,80	0,2*
40-мин католит	- 62,9	1179	151,93**	5,00 ± 0,20	0,25 ± 0,20	0,95	0,05

Примечание: различия с контролем значимы: *) p ≤ 0,05; **) p ≤ 0,01

обнаруженный в экспериментах на дафниях (Савостикова О.Н., 2008). В то же время, при экспозиции мух к католиту с ОВП = - 16,6 мВ количество отложенных яиц было меньше, чем в контроле. Важно, что в этой серии было обнаружено значимое по сравнению с контролем повышение частоты ПЭЛ, а также доли ПЭЛ в спектре мутационных событий. В этих экспериментах связи ОВП НАВ с частотами ПЭЛ обнаружено не было. В то же время, регрессионный анализ выявил связь между значениями ОВП вод, к которым были экспонированы самцы мух, и частотами образования РЭЛ в их половых клетках ($R^2=0,70$), причем самые высокие частоты РЭЛ были отмечены в контроле. Поэтому снижение частоты РЭЛ можно трактовать как гибель спермиев, несущих РЭЛ. Поскольку частота РЭЛ связана как с токсическим, так и с генотоксическим действием изучаемого фактора, обнаруженный эффект можно считать качественно близким наблюдавшемуся на культуре клеток человека (рис.1), что позволяет предположить единство механизмов индукции и элиминации генетических повреждений, индуцированных НАВ в обеих моделях.

На следующем этапе работы в подостром эксперименте на мышах *in vivo* изучали влияние НАВ на частоту aberrаций хромосом в клетках костного мозга. Животных в течение 30 дней выпаивали *ad libitum* НАВ, приготовленными на московской водопроводной воде¹.

Анализ полученных данных показал, что уже через 24 часа после начала выпаивания в костном мозге мышей, потреблявших католиты, в разной степени повышалась частота клеток с гепами (ахроматическими пробелами), образование которых связано с возникновением однонитевых разрывов ядерной ДНК (Gileva E.A., 2002.). Следует отметить, что гепы не относят к aberrациям хромосом и всегда учитывают отдельно. На 8 сутки в клетках костного мозга (рис.5А) было обнаружено повышение частоты фрагментов хромосом - индикатора двунитевых разрывов ядерной ДНК (Жимулев И.Ф., 2003; Клаг У., Каммингс М., 2007). Особенно ярко это было видно у мышей, потреблявших католит, полученный самой продолжительной активацией. На 15 и 30 сутки во всех сериях, кроме той, в которой мыши потребляли католит, активированный в течение 5 минут, наблюдалось снижение частоты клеток с aberrациями хромосом по сравнению с контролем, что может говорить о гибели поврежденных клеток².

В большинстве экспериментальных групп в разные сроки наблюдалось повышение митотической активности клеток (рис.5 Б), что следует рассматривать как еще один вариант проявления генотоксической активности (Andersen M.E. et al, 2010; Czakai K et al, 2011).

Объем воды, выпитой мышами, коррелировал с частотой клеток с aberrациями хромосом ($r=0,78$; $p=0,013$), что подтверждает индукцию этих генетических повреждений в результате потребления воды. В контрольной группе мышей объем выпитой воды в динамике эксперимента варьировал незначительно, в то время как в группах, потреблявших НАВ, он в

¹ Поскольку в динамике эксперимента наблюдалось значительное варьирование значений ОВП вод, для облегчения восприятия данных на рисунках указана продолжительность активации НАВ, а диапазоны варьирования ОВП приведены в виде таблицы:

Контроль	Католит 5 мин	Католит 20 мин	Католит 40 мин	Анолит
205 ± 227 мВ	118 ± 174 мВ	- 24 ± 74 мВ	-56 ± 41 мВ	236 ± 260 мВ

² Качественно схожие результаты (но в микроядерном тесте на клетках кишечника) были получены в поставленном позднее хроническом эксперименте на крысах (Сычева Л.П. и др, 2014).

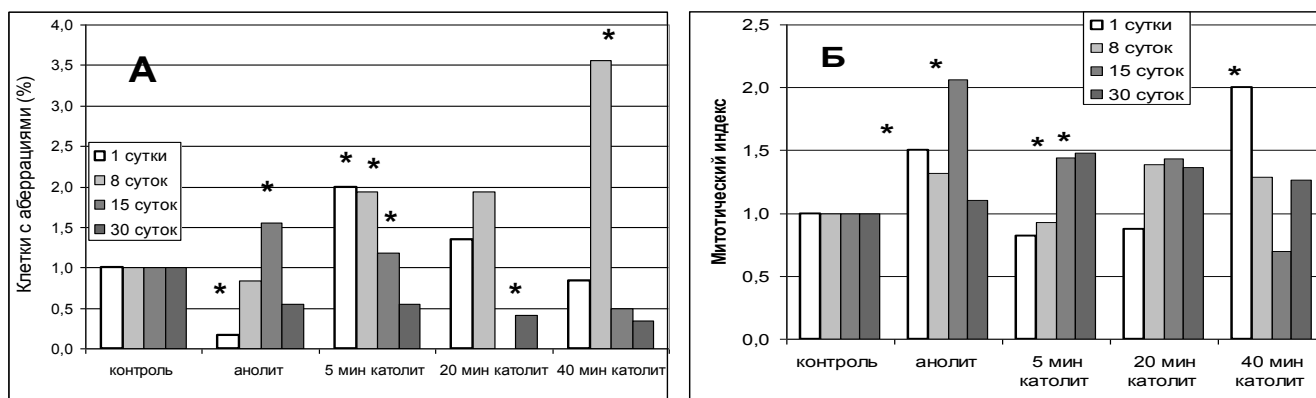


Рисунок 5. Изменение частоты абберрантных клеток (А) и митотической активности (Б) в костном мозге мышей, потреблявших католиты и анолит, полученные бесконтактной электрохимической активацией московской водопроводной воды (кратность по отношению к контролю).

начале эксперимента превышал уровень контроля, но затем быстро снижался. Близкие результаты были получены позднее в хроническом эксперименте на крысах (Беляева Н.Н. и др, 2015).

Со значениями ОВП НАВ прямо коррелировали частоты гепов в клетках костного мозга мышей ($r = 0,76$; $p=0,021$), а для митотического индекса эта корреляция была обратной ($r = -0,66$; $p=0,035$).

Приведенные данные позволяют сделать заключение о том, что именно свойства НАВ определяли обнаруженные генотоксические эффекты в клетках костного мозга животных.

Как и в опыте на культуре клеток (рис.3) в эксперименте на мышах обнаружен различный характер связи между основными цитогенетическими показателями у анолитов и католитов (рис.6). Так, для анолита повышение частоты абберрантных клеток сочеталось с уменьшением митотической активности ($R^2 = -0,71$), ситуация, стандартная для генотоксических воздействий (Harrison, Haber, 2006; Ferreira de Oliveira et al, 2014; Valerio-Santiago et al, 2013). Для 20- и 40-мин католитов, наоборот, частота абберрантных клеток повышалась с увеличением митотической активности ($R^2 = 0,35$ и $0,46$, соответственно) - подобным эффектом обладают канцерогены (Stopper et al, 2003).

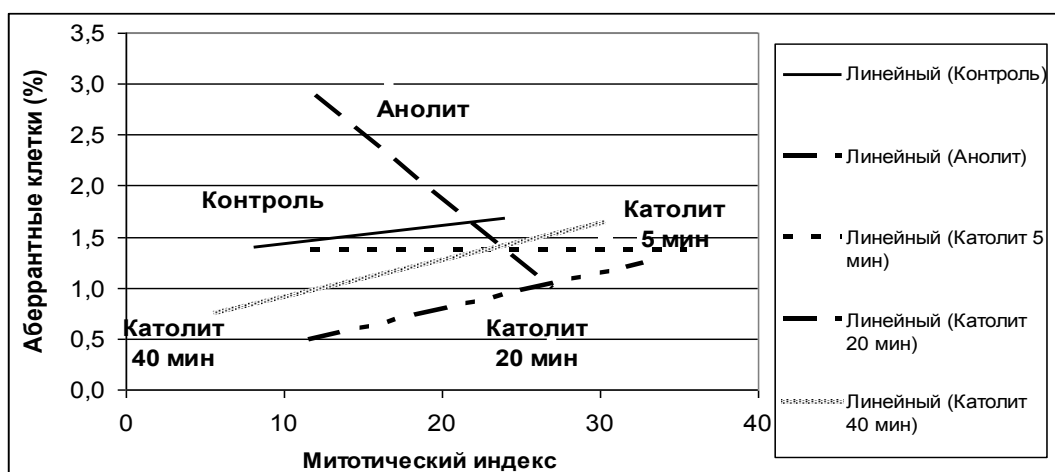


Рисунок 6. Соотношение частот хромосомных абберраций и митотической активности в костном мозге мышей при выпаивании различными видами НАВ. Линейные тренды.

Параллельно с постановкой эксперимента на мышах, воды, неконтактно активированные в первые сутки опыта, использовали для приготовления реконструированных сред, в которых

культивировали клетки крови человека. Результаты этого эксперимента показали, что инкубация клеток в среде на основе католита, активированного в течение 5 мин, приводила к увеличению пролиферативного пула, повышению частоты 3-ядерных клеток и частоты ускоренно делящихся клеток с повреждениями. В культурах на 20-мин католите также была отмечена повышенная частота 3-ядерных клеток. Важно, что похожие эффекты наблюдались в параллельных культурах, экспонированных разными дозами стандартного мутагена МННГ. При этом эффекты католитов и анолита существенно различались, однако дозовых зависимостей от ОВП в проявлении эффектов католитов выявлено не было. То есть, результаты, полученные на культуре клеток крови человека, качественно воспроизводили результаты эксперимента на мышах. Поэтому можно заключить, что микроядерный тест на культуре крови может служить адекватным экспресс-методом для качественного прогноза генотоксической активности НАВ.

Таким образом, все изученные НАВ обладали генотоксическим действием, которое проявлялось на одном или нескольких тест-объектах.

Хотя полиэтиленовые пакеты, использованные в наших экспериментах для получения НАВ, разрешены для хранения и замораживания грудного молока, была проведена оценка возможного влияния процесса активации воды на диффузию химических веществ из материала пленки в воду. По абсолютному большинству показателей все образцы неконтактно активированной воды не отличались от исходной, в которой содержание всех обнаруженных соединений не превышало долей ПДК для питьевых вод. Исключение составили неидентифицированные фталаты, содержание которых в католите, активированном при максимальной экспозиции, и в анолите, было значительно выше контроля.

До сих пор было принято считать, что основным параметром воды, определяющим ее биологическую активность, является ОВП (Стехин А.А., Яковлева Г.В., 2007; Широнос В.Г. и др, 2008). Анализ собственных данных, полученных на культуре клеток крови человека и мышах *in vivo* во всем диапазоне ОВП, не обнаружил связи показателей пролиферации и частоты генетических повреждений клеток с ОВП (рис.7). Результаты этого анализа также показали, что вне зависимости от минерального состава вод, использованных для приготовления НАВ, частоты клеток с повреждениями определялись уровнями митотической и пролиферативной активностей в опытах *in vivo* и *in vitro* (как это хорошо видно на примере осмотической воды, рис.7).

При отдельном рассмотрении эффектов католитов анолитов и оказалось, что для анолитов практически все показатели коррелировали ОВП и рН НАВ, а для католитов основные корреляции были со светосуммой люминол-геминовой хемиллюминесценции воды (СХЛ), причем это относилось как к показателям пролиферативной активности, так и к показателям повреждения ДНК. Эти данные не только еще раз подтверждают качественные различия в генотоксической активности католитов и анолитов, описанные выше (рис.3 и 7), но и вводят в круг физико-химических параметров, ответственных за генотоксические эффекты вод, полученных неконтактной электрохимической активацией, показатели активности свободнорадикальных реакций.

Поскольку осмотическая и московская водопроводная воды, на которых проводили описанные выше эксперименты, исходно имели достаточно высокие уровни хемиллюминесценции, что свидетельствует о значительной исходной активности свободнорадикальных реакций, следующий опыт был поставлен на бутилированной воде

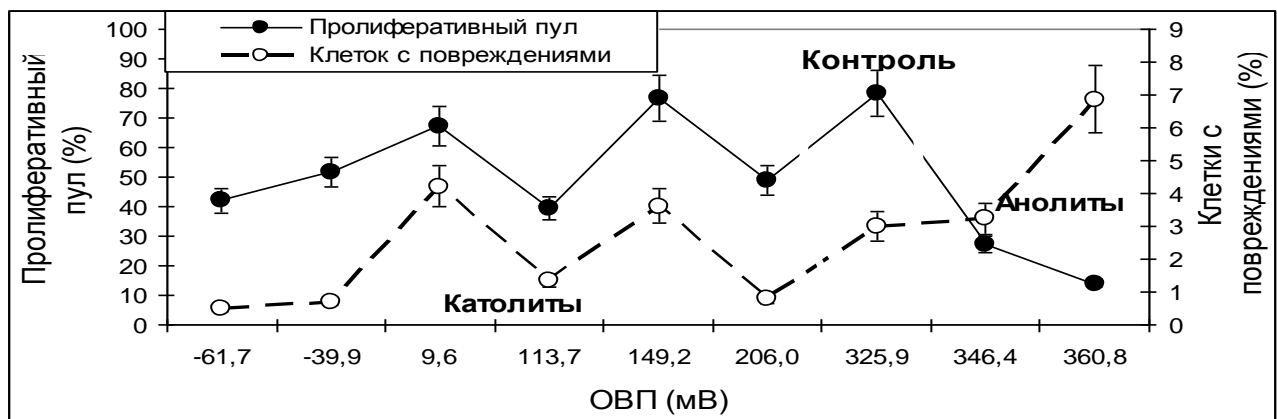


Рисунок 7. Связь между показателями пролиферации и повреждения клеток в культуре крови человека (реконструированные среды на основе осмотической воды)

«Пилигрим» с СХЛ = 0,14 усл.ед. Мы предположили, что НАВ, приготовленные на этой воде могут обладать меньшей генотоксической активностью, чем ранее изученные воды. Воду «Пилигрим» неконтактно активировали в тех же условиях, что осмотическую и московскую водопроводную воды, и аналогичным образом использовали для приготовления реконструированных сред для культивирования клеток крови человека. Основные результаты этого эксперимента показаны на рис.8.

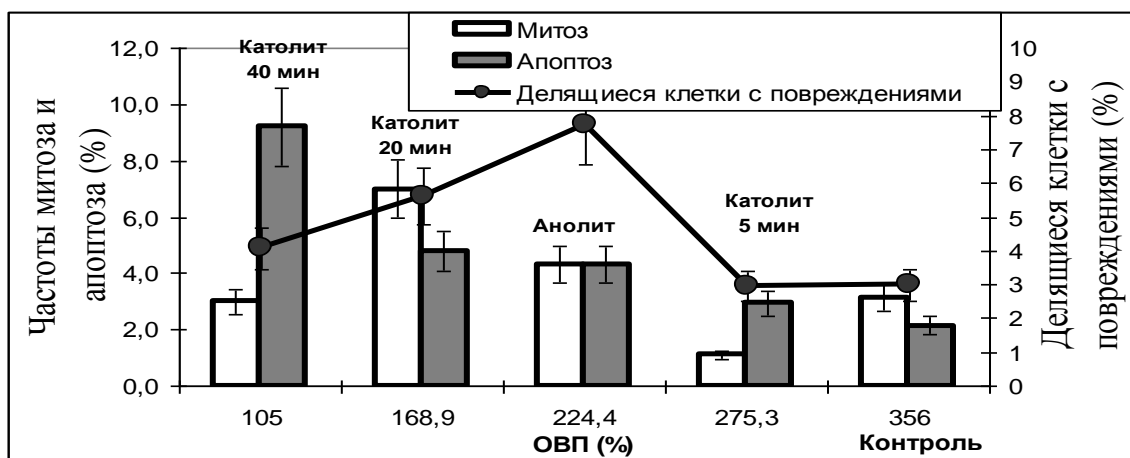


Рисунок 8. Частоты митоза и апоптоза (левая ось ординат) и частота делящихся клеток с повреждениями (правая ось ординат) в клетках крови человека, культивированных в реконструированных средах на основе активированной бутилированной воды «Пилигрим».

Как видно, в среде на 5 мин католите (ОВП = 275,3 мВ) митотическая активность клеток в культуре была значительно ниже контроля, а степень асимметрии расхождения хромосом в митозе в 6,8 раз превышала контрольный уровень ($p=0,021$). Католиты, полученные при более продолжительной активации, также как и анолит, стимулировали клетки к делению активнее, чем в контроле (что качественно воспроизводит картину, обнаруженную в клетках костного мозга мышей, рис.6). Увеличение пролиферативной активности сопровождалось повышением частоты поврежденных клеток. Например, в среде на 20 мин католите (ОВП = 168,9 мВ) наблюдалось более чем 4-кратное ($p=0,041$) повышение уровня контроля по частоте двуядерных клеток с множественными МЯ. Частота 2-ядерных клеток с НПМ в 3 раза превышала уровень контроля ($p=0,038$). В среде на 40-мин католите наблюдалось 5-кратное по сравнению контролем повышение частоты апоптоза ($p=0,014$), что говорит об увеличении числа клеток с нерепарируемыми генетическими повреждениями. В культурах на анолите

(ОВП = 224,4 мВ) было отмечено значительное торможение пролиферативной активности, а частоты 2-ядерных клеток с НПМ в 5 раз превышали уровень контроля ($p=0,018$). Важно, что эффекты католитов, полученных при активации воды «Пилигрим», так же как и для остальных изученных НАВ, качественно отличались от эффектов анолита.

Таким образом, культивирование клеток крови человека в НАВ на основе воды с очень малой активностью свободнорадикальных реакций, вопреки ожиданию, привело к повышению уровней нестабильности генома, причем эти эффекты были выражены более ярко, чем в культурах на НАВ, полученных активацией вод с высокой активностью свободнорадикальных реакций.

Проведенные исследования показали, что все использованные тесты: тест на индукцию ХА в клетках костного мозга мышей, тест на индукцию МЯ в клетках крови человека, культивированных в условиях цитокинетического блока, и тест на индукцию доминантных летальных мутаций в половых клетках дрозофилы оказались пригодными для выявления и оценки генотоксических эффектов НАВ. Полученные данные позволили создать на основе этих тестов минимальный набор для оценки потенциальной генотоксичности активированных вод, которую также можно использовать и для гигиенической оценки безопасности оборудования для их получения. Алгоритм применения этих тестов показан на рис. 9.

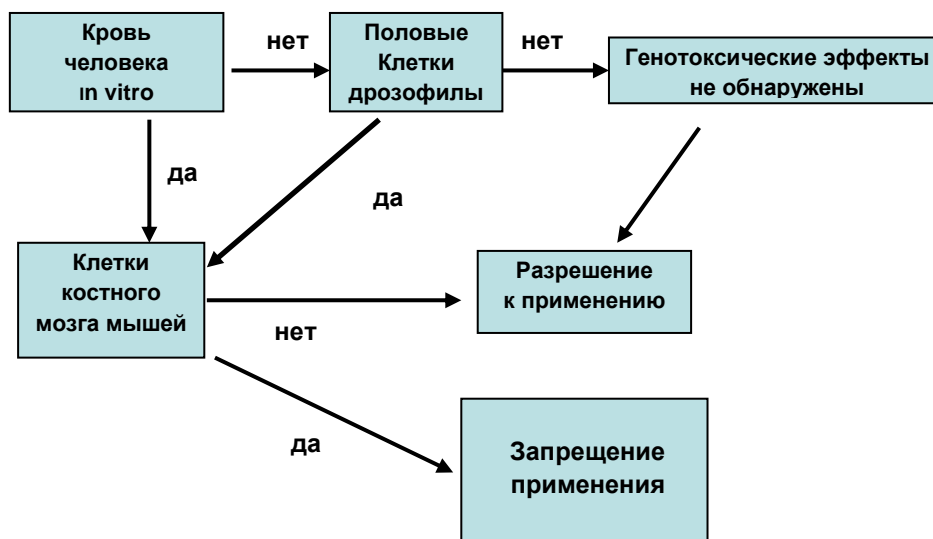


Рисунок 9. Алгоритм анализа генотоксических эффектов НАВ

Поскольку оценка генотоксических эффектов является частью токсикологических исследований, решение о запрещении применения активированных вод и технологий их подготовки принимают с учетом результатов всех остальных исследований.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты экспериментов, все изученные НАВ обладали генотоксическим действием, которое проявлялось на одном или нескольких тест-объектах. Самый обширный материал был получен на культуре клеток крови человека, что позволило провести более подробный анализ корреляционных связей между физико-химическими свойствами НАВ и эффектами нестабильности генома в реконструированных средах, приготовленных на их основе.

Анализ корреляционных связей между степенью минерализации исходной (неактивированной) воды и показателями частоты генетических повреждений лимфоцитов

крови человека, культивированных в реконструированных средах на основе НАВ (рис.10), обнаружил значимые ассоциации (критерий Спирмена) только для католитов: с частотой апоптоза ($r = 0,74$), и с частотой ускоренно делящихся клеток с повреждениями ($r = - 0,92$). Согласованность этих показателей в механизме образования эффектов нестабильности генома исключает случайность обнаруженных связей. Следует отметить, что для анолитов подобные связи выявлены не были, что может быть обусловлено небольшим количеством различных анолитов, изученных в данной работе *in vitro*.

Корреляционный анализ, проведенный в единой матрице для всех вод, изученных *in vitro* на клетках крови человека, не выявил значимых взаимосвязей между физико-химическими параметрами НАВ и нестабильностью генома. Однако проведенный раздельно для анолитов (табл.4) и католитов (табл.5) показал, что эффекты нестабильности генома в анолитах были ассоциированы с ОВП и с рН воды, а в католитах – с СХЛ. Обнаружение этих связей показывает, что эффекты нестабильности генома индуцируются в анолитах в результате переноса электронов, а в католитах – путем активации свободнорадикальных реакций. Так, для **анолитов** была выявлена значимая корреляционная связь ОВП и рН с митотической активностью в культуре, с частотами ускоренно делящихся клеток с генетическими повреждениями и апоптоза – то есть, и с показателями пролиферации клеток, и с показателями повреждения ДНК. Для **католитов** связи с ОВП и рН выявлено не было, но уровни СХЛ были ассоциативно связаны только с показателями пролиферативной активности. Следует понимать, что торможение пролиферации клеток обычно связано с индукцией генетических повреждений и необходимостью их репарации (Xingxu Huang et al, 2005; Niida, Nakanishi, 2006; Giunta, Jackson, 2011; Orth et al, 2012), а стимуляция – с закреплением имеющихся генетических повреждений в поколениях делящихся клеток и увеличением риска образования опухоли (Smits et al, 2007; Nikitin et al, 2014; Ogrunc et al, 2014).

Помимо уже рассмотренных физико-химических показателей (ОВП, рН, СХЛ) на индукцию эффектов нестабильности генома могла оказывать влияние доля связанной фазы НАВ и, более того, все изученные физико-химические показатели могли быть связаны между собой. Поэтому мы провели корреляционный анализ, в котором исследовали связь значений ОВП, рН и СХЛ с долей СФ НАВ. Неожиданно для нас (табл.6), значения ОВП были ассоциированы только с минимальной (0,0-0,1%) долей связанной фазы воды ($r=0,67$), уровень СХЛ – с несколько большей, чем для ОВП, ее представленностью в воде (0,1-0,3%; $r = - 0,78$ и $+0,87$). Анализ показал, что эффекты в средах на католитах и анолитах, не только качественно различались между собой, но и изменяли знак корреляции между изучаемыми параметрами при изменении доли СФ. Например, в средах на католитах, в которых доля СФ была невелика (0,1-0,2%), ее содержание было ассоциировано со снижением частоты апоптоза, а увеличение доли связанной фазы - с повышением частоты апоптоза. О справедливости выявленных закономерностей говорит согласованность обнаруженных эффектов между собой. Так, для анолитов с минимальной долей СФ было характерно не только снижение митотической активности, но и повышение частоты 1-ядерных (неделяющихся) клеток в спектре клеточных популяций. Поэтому в таких средах отмечено еще и снижение частоты ускоренно делящихся клеток с генетическими повреждениями (похожие связи показаны на рис.7). То же наблюдалось по доле асимметричных 3-ядерных клеток среди всех клеток, прошедших в культуре 2 митотических цикла: их частота снижалась с уменьшением пролиферативного пула культуры. Для католитов с максимальным содержанием СФ снижение частоты 1-ядерных клеток в

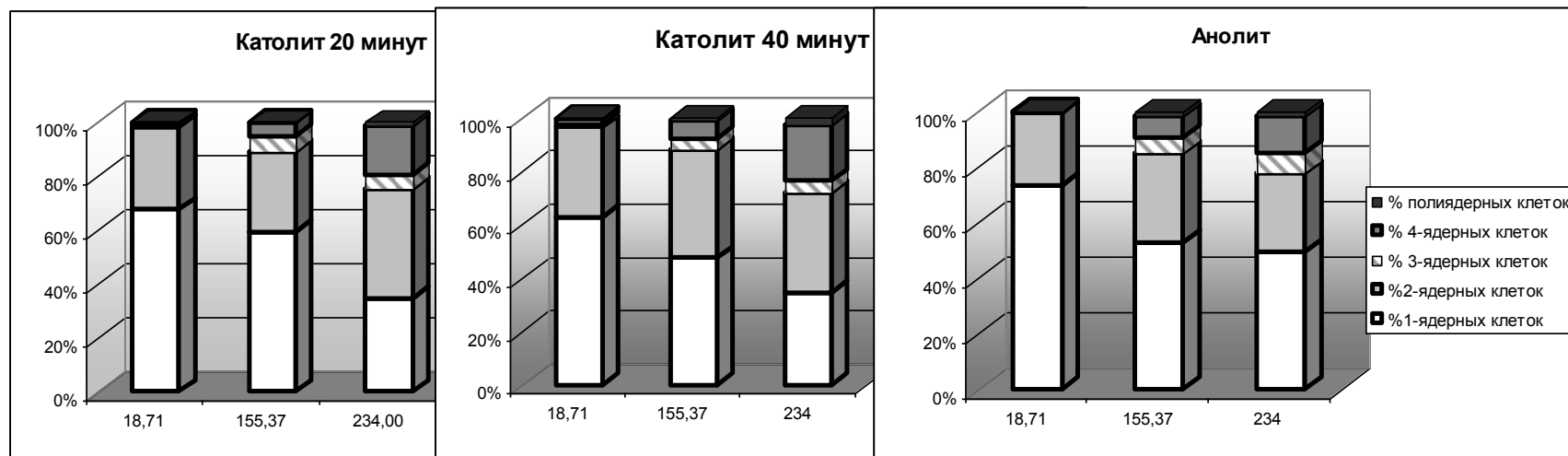
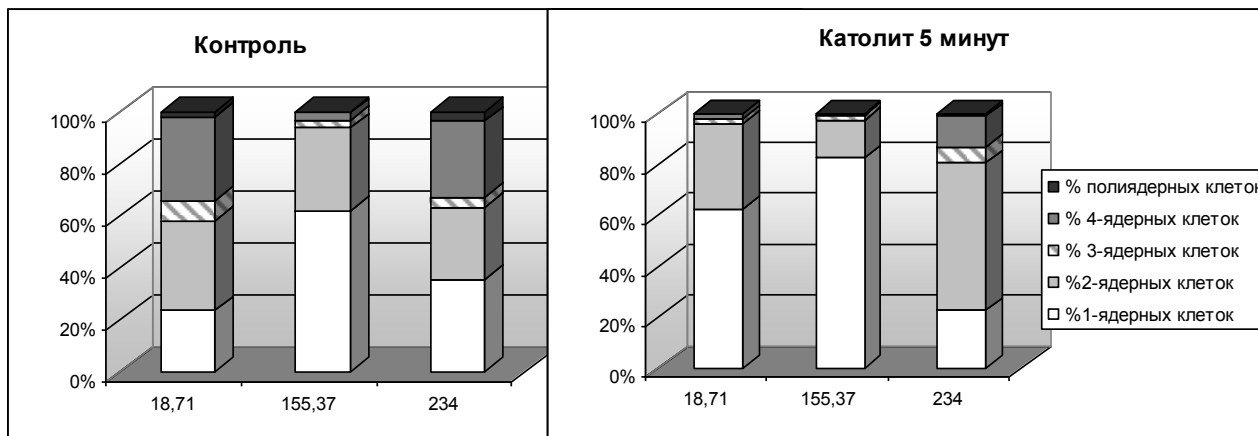


Рисунок 10. Динамика спектра клеточных популяций лимфоцитов крови человека, культивированных в реконструированных средах на основе НАВ, в зависимости от степени минерализации исходной (неактивированной) воды. По оси абсцисс – минерализация (мг/л), по оси ординат – доля каждой фракции клеток в спектре клеточных популяций

Таблица 4. Корреляции между показателями микроядерного теста на культуре клеток крови человека в реконструированных средах на **анолитах**, приготовленных на основе трех вод: осмотической, московской водопроводной и бутилированной воды «Пилигрим» (критерий Пирсона)

Показатель физико-химических свойств	Митоз (%)	Апоптоз (%)	Спектр клеточных популяций (%)							Пролиферативный пул	% ускоренно делящихся клеток с повреждениями	Степень асимметрии во 2-м митозе	Индекс репликации	Индекс пролиферации
			1 ядерных клеток	3- ядерных клеток	3- ядерных клеток с повреждениями	4- ядерных клеток с повреждениями	полиядерных клеток	полиядерных клеток с повреждениями	делящихся клеток					
светосумма хемилюминисценции	0,48	- 0,66	- 0,62	0,68	0,59	0,51	0,61	0,22	0,59	0,59	0,37	0,37	0,67	0,63
	p=0,53	p=0,34	p=0,38	p=0,32	p=0,41	p=0,50	p=0,39	p=0,78	p=0,40	p=0,41	p=0,62	p=,62	p=0,33	p=0,36
ОВП	- 0,99	0,93	0,95	- 0,92	- 0,96	- 0,98	- 0,95	- 0,98	- 0,93	- 0,94	- 0,99	- 0,99	-0,89	-0,89
	p=0,014	p=0,072	p=0,055	p=0,08	p=,04	p=,019	p=0,049	p=,013	p=0,074	p=,064	p=0,00	p=0,00	p=0,11	p=0,10
рН	0,99	- 0,98	- 0,98	0,97	0,99	0,99	0,98	0,94	0,97	0,98	0,97	0,98	0,96	0,96
	p=0,01	p=0,019	p=0,02	p=0,03	p=0,02	p=,010	p=0,018	p=0,059	p=0,02	p=0,02	p=0,02	p=0,02	p=0,04	p=0,04

Таблица 5. Корреляции между показателями микроядерного теста на культуре клеток крови человека в реконструированных средах на **католитах**, приготовленных на основе 3 трех вод: осмотической, московской водопроводной и бутилированной воды «Пилигрим» (критерий Пирсона)

Показатель физико-химических свойств	Спектр клеточных популяций (%)							Пролиферативный пул	% ускоренно делящихся клеток	Степень асимметрии во 2-м митозе	Индекс репликации	Индекс пролиферации
	1 ядерных клеток	2- ядерных клеток	4-ядерных клеток	4- ядерных клеток с повреждениями	полиядерных клеток	делящихся клеток	делящихся клеток с НПМ					
светосумма хемилюминисценции	- 0,71	0,58	0,77	0,69	0,70	0,73	0,59	0,72	0,72	- 0,27	0,75	0,75
	p=0,01	p=0,047	p=0,00	p=0,01	p=,01	p=0,01	p=0,04	p=0,01	p=0,01	p=0,41	p=0,01	p=0,01
ОВП	0,18	- 0,33	- 0,17	0,00	- 0,21	- 0,24	0,12	- 0,22	-0,09	0,63	- 0,22	- 0,23
	p=0,58	p=0,30	p=0,59	p=0,99	p=0,51	p=0,45	p=0,71	p=0,48	p=0,77	p=0,03	p=0,49	p=0,47
рН	- 0,19	0,32	- 0,14	0,21	-0,20	0,14	0,13	0,14	-0,09	0,19	- 0,00	0,02
	p=0,55	p=0,32	p=0,66	p=0,51	p=0,53	p=0,67	p=0,69	p=0,66	p=0,78	p=0,55	p=0,99	p=0,96

Таблица 6. Связь интегральных показателей нестабильности генома в клетках крови человека с долей связанной (структурированной) фазы в водах, использованных для приготовления реконструированных сред (католиты, анолиты и контроль анализировали отдельно, критерий Пирсона)

Диапазон варьирования доли связанной фазы НАВ, (%)	Частота митоза	Частота апоптоза	% 1-ядерных клеток в спектре клеточных популяций	% 1-ядерных клеток	% делящихся клеток с МЯ	% делящихся клеток с генетическими повреждениями	% делящихся клеток в спектре клеточных популяций	Пролиферативный пул	% ускоренно делящихся клеток с генетическими повреждениями	Симметрия расхождения генетического материала в клетках 2-го митоза
0,0 - 0,1	-		+						-	-
0,101-0,2		-					+			
0,201-0,3										
0,301-0,4		+			+					
0,401-0,5				+	+	+				
0,501-0,6		+		+	+	+				
0,901-1,0			+				-	-		+

Примечание: показаны только корреляции при $p \leq 0,05$

-	обратная корреляция
+	прямая корреляция
Анолит	Католит
	Контроль

спектре клеточных популяций согласовалось со снижением суммарной частоты делящихся клеток (т.е. снижением объема пролиферативного пула).

Полученные данные позволяют предположить, что изменение доли СФ воды может рассматриваться как еще один новый фактор, ответственный за индукцию нестабильности генома под действием активированных питьевых вод. Естественно, для детального понимания механизмов влияния активированной воды на генотоксические эффекты в живой клетке необходимо проводить специальные исследования, не входящие в задачи данной работы. В то же время, современные представления о транспорте воды в клетку включают два основных механизма: диффузное проникновение отдельных молекул воды через мембрану клетки за счет разницы в осмотическом давлении и транспорт через селективные каналы, «организованные» семейством белков аквапоринов, энергия активации которых в 2-3 раза меньше, чем для диффузного транспорта воды (Agre, Kozono, 2003; Saito et al, 2013; Thommie Karlsson et al, 2013; Шапигузов А.Ю., 2004). То есть, транспорт воды через канал, по крайней мере, в 2 раза более энергетически выгоден, чем диффузный осмос. У человека аквапорины (сейчас известно 10 видов) были найдены в разных тканях, включая почки, мозг, эритроциты крови и др; диаметр пор составляет 3Å , что лишь немного больше диаметра молекулы воды. Каждый такой канал в клетках эукариот пропускает через себя до 300 молекул воды в секунду, что говорит о высокой значимости этого механизма для жизнедеятельности клетки. Аквапорины пропускают в клетку только нейтральные молекулы воды, отсеивая даже ионы гидроксония, причем при прохождении по каналам имеющиеся в воде водородные связи разрываются, и в клетки попадают только отдельные молекулы воды. Поэтому можно предположить, что увеличение доли связанной фазы воды в процессе активации может негативно отражаться на стабильности генома и жизнеспособности клеток.

Таким образом, все собственные экспериментальные данные, полученные в настоящем исследовании, позволяют предположить, что при неконтактной (электрохимической) активации воды может реализовываться не один, а несколько механизмов индукции нестабильности генома:

А) под действием свободных радикалов, образующихся в католитах, которые повреждают мембраны клеток по механизму индукции перекисного окисления липидов;

Б) под действием электронов, делокализованных на СФ НАВ, при взаимодействии которых с клеточной мембраной может происходить локальное окисление и дальнейшее разрушение фрагментов;

В) в результате образования генотоксичных соединений в воде в процессе ее неконтактной активации в полиэтиленовой или полипропиленовой таре (при выходе небольшого количества мономера и/или пластификатора в воду, в которой присутствуют электроны, ионы, радикалы и ион-радикалы, образовавшиеся в процессе неконтактной активации).

Таким образом, полученные данные показали, что состав исходной (неактивированной) воды, также как и режим активации играют существенную роль в приобретении водой генотоксической активности.

Выводы

1. При неконтактной (электрохимической) активации питьевая вода различного происхождения и солевого состава может приобретать генотоксическую активность, которая проявляется на различных живых тест-объектах, в основном, как изменение митотической / пролиферативной активности, а также изменение частоты клеток с генетическими

повреждениями и клеток в состоянии апоптоза. Кроме того, культивирование в реконструированных средах на основе НАВ повышало чувствительность генома лимфоцитов крови человека к действию стандартного мутагена МННГ, что, преимущественно, проявлялось в увеличении частоты клеток в состоянии апоптоза и доли клеток 2 митоза с асимметричным распределением генетического материала.

2. Состав исходной (неактивированной) воды и режим активации играют существенную роль в приобретении ею генотоксической активности. НАВ из московской водопроводной воды с минерализацией 234 мг/л менее всего тормозили пролиферативную активность лимфоцитов крови человека, культивированных в реконструированных средах, приготовленных на их основе. Влияние минерализации на частоту генетических повреждений, индуцированных НАВ на культуре лимфоцитов крови человека (повышение частоты апоптоза, $r = 0,74$ и снижение частоты ускоренно делящихся клеток с повреждениями, $r = - 0,92$) выявлено только у католитов.

3. С увеличением продолжительности неконтактной активации значительно снижалась пролиферативная активность лимфоцитов крови человека, культивированных в реконструированных средах на основе НАВ: увеличивалась доля неделящихся (1-ядерных) клеток и уменьшалась численность фракций делящихся клеток, эти изменения особенно были ярко выражены в культурах на анолитах. Во всех культурах указанные изменения сопровождались снижением частоты делящихся клеток с повреждениями. В культурах на католитах указанные изменения сопровождались, кроме того, повышением степени асимметрии распределения генетического материала во втором митотическом цикле.

4. В динамике подострого эксперимента на мышах показано, что через сутки после начала выпаивания католитами, приготовленными на московской водопроводной воде, в костном мозге животных обнаруживалось повышение частоты клеток с ХА (максимально для католита, активированного в течение 5 мин – в 2,4 раза по сравнению с контролем) и с гепами (максимально для католита, активированного 20 мин - в 2,6 раза по сравнению с контролем). Через 8 суток повышение частоты ХА (максимально в 3,6 раза превышающее уровень контроля) наблюдалось у животных, потреблявших католит, активированный 40 мин, а через 15 и 30 суток частота поврежденных клеток не отличалась от контроля. При выпаивании анолита в первые сутки наблюдалось снижение частоты ХА по сравнению с контролем, а на 15 суток - ее достоверное превышение.

5. В механизмах возникновения эффектов нестабильности генома, индуцированных католитами и анолитами, полученными из одной и той же воды, играют роль разные физико-химические свойства НАВ:

- в анолитах митотическая активность культуры, частота ускоренно делящихся клеток с генетическими повреждениями и частота апоптоза ассоциированы с уровнями ОВП и рН, а в католитах – со светосуммой люминол-геминовой хемилюминесценции;

- в анолитах частота делящихся клеток с повреждениями в культуре крови, также как частота клеток с абберациями хромосом в костном мозге мышей уменьшались с увеличением пролиферативного пула (что характерно для действия мутагенов), в то время как для католитов в этих условиях – увеличивались (что описано для канцерогенов).

6. Неконтактная (электрохимическая) активация вызывала изменение доли связанной фазы воды, что в культуре клеток крови человека ассоциировано с индукцией эффектов нестабильности генома. Поэтому изменение структуры неконтактно электрохимически активированной воды может являться новым механизмом индукции генотоксических эффектов в живом организме, а структура воды - новым фактором генетического риска, требующим серьезного изучения.

7. Разработанный алгоритм оценки безопасности неконтактно (электрохимически) активированных вод, включающий анализ нестабильности генома лимфоцитов крови человека, культивированных в условиях цитокинетического блока в реконструированных средах на

основе изучаемых НАВ, анализ доминантных летальных мутаций в половых клетках *Drosophila melanogaster* и (в случае положительного ответа в одном из этих тестов) анализ частоты хромосомных aberrаций в клетках костного мозга самцов мышей в краткосрочном эксперименте, позволяет оценивать безопасность любых технологий для получения активированных питьевых вод.

8. Проведенные исследования свидетельствуют о том, что использование электрохимического метода активации воды для постоянного и неограниченного по объему употребления населением недопустимо. Поэтому перед получением разрешительной документации на приборы, изменяющие физико-химические свойства питьевой воды, следует проводить дополнительные исследования для оценки их генетической безопасности.

Список работ опубликованных по теме диссертации

В изданиях рекомендованных ВАК:

1. **Зацепина О.В.**, Стехин А.А., Яковлева Г.В. Ион-радикальные формы кислорода - основной показатель, отражающий электрон-донорную способность воды // Гигиена и санитария. - 2013.- №2. - С.83-87
2. **Зацепина О.В.**, Ингель Ф.И., Стехин А.А., Яковлева Г.В., Савостикова О.Н, Алексеева А.В., Иксанова Т.И. Изменение физико-химических параметров питьевой воды путем мембранной электрохимической активации влечет за собой возникновение эффектов нестабильности генома *in vitro* и *in vivo* // Материалы докладов на XVIII Всероссийском конгрессе «Экология и здоровье человека», 8-10.10.2013. - Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013.- Т15. - №3(6). - С.1783-1790.
3. **Зацепина О.В.**, Ингель Ф.И, Стехин А.А., Яковлева Г.В. Влияние физически активированной воды на пролиферативную активность и апоптоз лимфоцитов крови человека *in vitro* // Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие. - 2013. - т.8.- №3.- С.44-55.

В иностранных журналах:

4. Ingel F, **Zatsepina O**, Stekhin A, Yakovleva G, Savostikova O, et al. (2013) Electrochemically Activated Tap Water Induced Effects of Genomic Instability in Various Living Objects *In Vitro* and *In Vivo*. *Occup Med Health Aff2*: 143. doi:10.4172/2329-6879.1000143. <http://dx.doi.org/10.4172/2329-6879.1000143>

В материалах и сборниках конгрессов, симпозиумов и научно – практических конференций, в том числе международных:

5. **Зацепина О.В.**, Ингель Ф.И., Яковлева Г.В., Савостикова О.Н., Стехин А.А. Влияние бесконтактно-активированных энергоинформационных вод на генотоксические эффекты в клетках костного мозга мышей.// IV съезд токсикологов России. - Сб. трудов. - Москва, 6-8 ноября 2013. - С.215-217.
6. **Зацепина О.В.**, Ингель Ф.И., Яковлева Г.В., Савостикова О.Н., Стехин А.А., , Алексеева А.В., Иксанова Т.И. Влияние бесконтактно-активированных энергоинформационных вод на генотоксические эффекты в клетках костного мозга мышей // Материалы Пленума научного совета по экологии человека и гигиене окружающей среды РФ «Приоритеты профилактического здравоохранения в устойчивом развитии общества: состояние и пути решения проблем». / под. ред. академика РАМН Ю.А.Рахманина. – Москва, 12-13 декабря 2013. - С.152-155.
7. **Зацепина О.В.**, Стехин А.А., Яковлева Г.В., Пьянзина И.П. Особенности изменений

электрохимических параметров воды, активированной структурно-напряженным мицеллатом кальция, в процессе хранения // Материалы пленума Научного совета по экологии человека и гигиене окружающей среды РФ «Научно-методические и законодательные основы совершенствования нормативно-правовой базы профилактического здравоохранения: проблемы и пути их решения» / под. ред. академика РАМН Ю.А.Рахманина. – Москва, 13-14 декабря 2012. - С.156-159.

8. **Зацепина О.В.**, Стехин А.А., Яковлева Г.В. Эффекты квантовой нелокальности в процессах активации воды // Материалы пленума Научного совета по экологии человека и гигиене окружающей среды РФ «Научно-методические и законодательные основы совершенствования нормативно-правовой базы профилактического здравоохранения: проблемы и пути их решения». / под. ред. академика РАМН Ю.А.Рахманина. – Москва, 13-14 декабря 2012. - С.159-162.

9. **Зацепина О.В.** Нестабильность генома лимфоцитов периферической крови человека, культивированных в присутствии воды с измененными физическими параметрами // IV Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье. Молодые ученые за устойчивое развитие страны в глобальном мире». – Сб. тезисов. – Москва, 27-28 сентября 2012. - С.142-144.

10. **Зацепина О.В.** Генотоксическая активность неконтактно (электрохимически) активированных питьевых вод в экспериментах *in vitro* // Материалы V Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов с международным участием «Окружающая среда и здоровье. Здоровая среда – здоровое наследие» / под ред. Академика РАН Ю.А.Рахманина. – Москва, 25-26 сентября 2014. – С. 174-179.

11. **Зацепина О.В.**, Ингель Ф.И. Генотоксические эффекты в лимфоцитах крови человека, культивированных в средах на основе неконтактно (электрохимически) активированных питьевых вод // Материалы VIII Всероссийского форума «Здоровье нации – основа процветания России» - Москва, 18-20 июня 2014. – С.171-192.

<http://www.znopr.ru/files/download/796d19d8eaf86c8>

12. **Зацепина О.В.** Влияние воды с бесконтактно измененными физическими параметрами на показатели нестабильности генома лимфоцитов в культуре периферической крови человека // VIII Международный симпозиум «Экология человека и медико-биологическая безопасность населения». - Тез. докл. - Венгрия-Австрия, 20-29 октября 2012. - С. 25-28.

13. **Зацепина О.В.**, Стехин А.А., Яковлева Г.В., Иксанова Т.И. Роль макроскопических квантовых состояний электронов активных форм кислорода в клеточном метаболизме // VIII Международный симпозиум «Экология человека и медико-биологическая безопасность населения». - Тез. докл. - Венгрия-Австрия, 20-29 октября 2012. - С. 29-35.

14. **Olga Zatsepina**, Faina Ingel, Galina Yakovleva, Anatoly Stekhin, Olga Savosticova, Anna Alekseeva Water with altered physical properties influence to genomic instability of cultivated human blood lymphocytes // 42nd Annual meeting of the European Environmental Mutagen Society. - Abstr. Book. - Warsaw, Poland, 16-20 September 2012. - P.196.

Принятые сокращения:

МННГ – N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин

МИ – митотический индекс

МЯ - микроядро

НА – неконтактная активация

НАВ – неконтактно активированная вода

НПМ – нуклеоплазменный мост

ОВП – окислительно-восстановительный потенциал,

ПЭЛ – поздние эмбриональные летали

РЭЛ – ранние эмбриональные летали

СФ – связанная (структурированная фаза)

СХЛ – светосумма люминол-геминовой хемилюминесценции

СЭЗ – санитарно-эпидемиологическое заключение

ХА – хромосомные аберрации

ЦХВ – цитохалазин В

pH – водородный показатель