

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены
окружающей среды им. А.Н. Сысина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

ЗАЦЕПИНА ОЛЬГА ВАЛЕРЬЕВНА

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПИТЬЕВЫХ ВОД,
ПОЛУЧЕННЫХ НЕКОНТАКТНОЙ
ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИЕЙ

14.02.01 – Гигиена

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Ингель Фаина Исааковна

Москва 2015

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	28
2.1. Характеристика питьевых вод, использованных для неконтактной активации.....	28
2.2. Неконтактная активация воды.....	29
2.3. Определение физико-химических показателей активированных вод...	31
2.3.1. Определение водородного показателя, окислительно-восстановительного потенциала и электропроводности исследуемых вод.....	31
2.3.2. Определение доли связанной (структурированной) фазы в воде.....	31
2.3.3. Определение светосуммы люминол-геминовой хемилюминесценции.....	35
2.3.4. Определение химического состава исходных и неконтактно активированных вод.....	36
2.4. Оценка нестабильности генома на культуре клеток крови человека...	37
2.4.1. Проведение исследования в реконструированных средах.....	37
2.4.2. Фиксация клеток.....	38
2.4.3. Цитогенетический анализ.....	39
2.4.4. Статистическая обработка данных.....	41
2.5. Оценка частоты аберраций хромосом в клетках костного мозга мышей.....	42
2.5.1. Животные.....	42
2.5.2. Цитогенетический анализ.....	43
2.5.3. Статистический анализ.....	44
2.5.4. Оценка результатов.....	45

2.6. Оценка частоты доминантных летальных мутаций в половых клетках дрозофилы.....	45
2.6.1. Постановка эксперимента и анализ результатов.....	46
2.6.2. Статистическая обработка данных.....	47
2.7. Оценка влияния неконтактно активированных вод на жизнеспособность бактерий.....	47
2.8. Объем проведенных исследований.....	49
ГЛАВА 3. АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ НЕКОНТАКТНО АКТИВИРОВАННЫХ ВОД НА ОСНОВЕ ОСМОТИЧЕСКОЙ ВОДЫ НА ПОКАЗАТЕЛИ НЕСТАБИЛЬНОСТИ КЛЕТОК КРОВИ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO.....	50
3.1. Спонтанные эффекты.....	50
3.2. Оценка чувствительности генома к действию стандартного мутагена.....	57
3.3. Заключение по главе.....	62
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ НЕКОНТАКТНО АКТИВИРОВАННЫХ ВОД НА ОСНОВЕ ВОДОПРОВОДНОЙ ВОДЫ.....	65
4.1. Химический состав московской водопроводной воды и неконтактно активированных вод, полученных на ее основе.....	66
4.2. Оценка нестабильности генома на культуре клеток крови человека.....	68
4.2.1. Спонтанные эффекты.....	68
4.2.2. Оценка чувствительности генома к действию стандартного мутагена.....	73
4.3. Оценка генотоксических эффектов в клетках костного мозга мышей...	83
4.4. Оценка генотоксических эффектов в половых клетках <i>Drosophila melanogaster</i>	94
4.5. Заключение по главе.....	98
ГЛАВА 5. ИНДУКЦИЯ ЭФФЕКТОВ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА КЛЕТОК КРОВИ ЧЕЛОВЕКА НЕКОНТАКТНО АКТИВИРОВАННЫМИ ВОДАМИ НА ОСНОВЕ БУТИЛИРОВАННОЙ ВОДЫ «ПИЛИГРИМ».....	99

ГЛАВА 6. АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ НЕКОНТАКТНО АКТИВИРОВАННЫХ ВОД НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ E.Coli И B.Sereus.....	106
ГЛАВА 7. СИСТЕМА ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ АКТИВИРОВАННЫХ ПИТЬЕВЫХ ВОД И ТЕХНОЛОГИЙ ИХ ПРИГОТОВЛЕНИЯ.....	112
ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ. СВЯЗЬ ЭФФЕКТОВ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА С ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ НЕКОНТАКТНО АКТИВИРОВАННЫХ ВОД.....	114
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	131
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	135
ВЫВОДЫ.....	136
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	139
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	162

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ	- Всемирная организация здравоохранения
ДЛМ	- тест на индукцию доминантных летальных мутаций
ИП	- индекс пролиферации ядер
ИР	- индекс репликации ядер
МИ	- митотический индекс
МННГ	- N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин
МЯ	- микроядро
НА	- неконтактная (электрохимическая) активация
НАВ	- неконтактно электрохимически активированная вода
НПМ	- нуклеоплазменный мост
ОВП	- окислительно-восстановительный потенциал
ПЭЛ	- поздние эмбриональные летали
РЭЛ	- ранние эмбриональные летали
СанПиН	- санитарные правила и нормы
СХЛ	- светосумма люминол-геминовой хемилюминесценции
СЭЗ	- санитарно-эпидемиологическое заключение
ТУ	- технические условия
ФГА	- фитогемаглютинин
ЦХВ	- цитохалазин В

ВВЕДЕНИЕ

«Жизнь, по сути дела, представляет собой форму устойчивого существования неустойчивых структур, чья нестабильность еще больше возрастает в присутствии воды. Но именно последний фактор, как это ни парадоксально, обеспечивает основу для длительного существования неустойчивых биологических структур»
(Аксенов, 2004)

Актуальность темы. Проблема качества питьевой воды на современном этапе развития цивилизации являются одной из ключевых, поскольку непосредственно связана с состоянием здоровья как ныне живущих, так и будущих поколений людей. Известно, что качество питьевой воды определяется не только ее солевым составом, наличием органических и неорганических загрязнителей, содержанием микрофлоры, но и физико-химическими свойствами. [20, 87, 93, 119]. Поэтому в настоящее время широкое распространение получили разнообразные технологии водоподготовки, значительно изменяющие физико-химические свойства питьевой воды. Анализ доступной литературы показал, что примерно в 80% случаев эти технологии основаны на явлении электрохимической активации. Приборы для электрохимической активации воды производятся как в России [81, 82, 114], так и в других странах [131, 135, 158, 179], широко рекламируются и рекомендуются для использования населением. Имеется большое количество публикаций, описывающих положительные результаты применения электрохимически 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 [11, 117, 123, 163, 168]. В то же время **экспериментальных** исследований биологической активности электрохимически активированных питьевых вод явно недостаточно для разрешения бесконтрольного использования их населением [87, 93]. Следует отметить, что

вопрос об оценке безопасности электрохимически активированных питьевых ранее не поднимался, поскольку в соответствии с регламентами применения электрохимических активаторов питьевой воды в прибор поступает вода, удовлетворяющая условиям СанПиН по химическому составу, и, следовательно, после активации вода также должна соответствовать этим условиям.

При контактной электрохимической активации вода обогащается ионами тяжелых металлов, источником которых является материал электродов, а также ионами, образующимися при разложении воды, содержащихся в ней солей и в результате их последующего окисления или восстановления [68]. Поэтому для улучшения качества активированной питьевой воды было предложено использовать неконтактную электрохимическую активацию (НА), когда вода в тонкостенном полиэтиленовом пакете (стакане) погружается в емкость с контактно электрохимически активированной водой. После этого воздействия происходит изменение физических параметров воды, которое не сопровождается изменением химического состава [50, 117]. Приборы для неконтактной активации признаны более безопасными, чем контактные электролизеры. Однако известно, что в процессе неконтактной электрохимической активации у воды изменяются окислительно-восстановительный потенциал (ОВП), доля структурированной (связанной) фазы в воде и другие физико-химические свойства [60, 100], что оказывает влияние на процессы формирования, стабилизации и функционирования клеточных мембран, а также белков и ДНК [2]. Эти данные позволяют предположить у неконтактно активированных вод (НАВ) наличие генотоксической активности, что выводит на передний план гигиенических исследований экспериментальную оценку безопасности электрохимически активированных вод, и – в особенности – анализ отдаленных (генотоксических) эффектов. Бесконтрольная продажа и пропаганда использования в быту приборов для неконтактной 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 артезианской воды с низкой минерализацией, московской водопроводной воды и бутилированной поземной питьевой воды, индуцировали генотоксические эффекты в половых клетках *Drosophila melanogaster*, на клетках крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока и клетках костного мозга мышей *in vivo*.

- впервые установлено, что католиты и анолиты, полученные неконтактной активацией одной и той же воды, индуцируют генотоксические эффекты по принципиально различным механизмам: уровни генотоксических эффектов католитов ассоциативно связаны со светосуммой люминол-геминовой хемилюминесценции воды (СХЛ), а анолитов – со значениями ОВП и pH;

- впервые продемонстрировано, что характерная для действия радиации и химических мутагенов отрицательная ассоциативная 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 различных питьевых вод) соблюдалась только для анолитов, в то время как для католитов эта связь была прямой;

- впервые установлено, что генотоксические эффекты НАВ, индуцированные в живых объектах, находящихся на разных уровнях организации, связаны не только с условиями активации, но и с составом (минерализацией) исходной (неактивированной) воды, поэтому разные воды, неконтактно активированные в одинаковых условиях, могут обладать различными физико-химическими свойствами и разной биологической активностью;

- впервые доказано, что результаты оценки уровня нестабильности генома на культуре клеток крови человека корректно качественно прогнозируют цитогенетический эффекты НАВ на клетках костного мозга мышей, определенные в подостром эксперименте;

- впервые установлено, что ни один из изученных физико-химических параметров воды (степень минерализации, pH, доля СФ, ОВП, СХЛ и режим активации) полностью не определяет генотоксическую активность НАВ;

- 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. Показано, что микроядерный тест на клетках крови человека, культивированных в условиях цитокинетического блока, по чувствительности к действию НАВ близок тесту на клетках костного мозга мышей *in vivo* и на качественном уровне дает удовлетворительный прогноз индукции мутаций и изменения пролиферативной активности.

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 эффектов 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 по экологии человека и гигиене окружающей среды академиком РАН Ю.А.Рахманиным методические рекомендации по оценке генетической безопасности питьевых вод, полученных неконтактной электрохимической активацией.

Методология и методы исследования

Методологической основой исследования являлась оценка генетических повреждений в комплексе с анализом митотической или пролиферативной активности клеток в культуре крови человека, клетках костного мозга мышей в рамках 30-суточного эксперимента, а также оценка частоты доминантных летальных мутаций в половых клетках самцов *Drosophila melanogaster*, индуцированных неконтактно (электрохимически) активированными водами. Основными методами исследования являлись цитогенетический анализ комплекса показателей нестабильности генома в микроядерном тесте с цитохалазином В, анализ частоты хромосомных aberrаций, оценка фертильности и частот ранних и поздних летальных мутаций в потомстве самцов мух. Бактерицидную активность неконтактно активированных вод определяли по жизнеспособности музейного штамма *E.coli* 1257 и аптечного штамма *B.cereus* IP 5832. Выбор тестов, тест-объектов и дизайна исследования проводили в соответствии с Test Guideline OECD 487. In vitro mammalian cell micronucleus test, 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.

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. Неконтактно полученные анолиты и католиты различаются качественно по влиянию на пролиферативную и митотическую активность клеток *in vitro* и *in*

vivo, а также по ассоциативной связи генотоксических эффектов с физико-химическими параметрами НАВ: для католитов основные эффекты связаны со светосуммой люминол-геминовой хемилюминесценции, а для анолитов – с ОВП и рН.

3. Изменение доли связанной фазы воды, полученной неконтактной электрохимической активацией, связано с наличием 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.

Достоверность результатов обеспечена большим количеством экспериментальных данных и их грамотной статистической обработкой. Определение физико-химических параметров активированных вод проведено на сертифицированном оборудовании с использованием стандартизованных методик и лицензионных компьютерных программ. В работе использованы кондиционные животные, современные методики цитогенетического анализа и обработки исходной информации. Культивирование лимфоцитов крови человека проведено в реконструированных средах, приготовленных на основе стандартной сухой среды RPMI-1640, основным компонентом которых является изучаемая активированная вода.

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 и 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.

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 ЭЧ и ГОС 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.

Апробация работы

Работа докладывалась и обсуждалась на: Экватэк 2012 «Вода, экология и технология» (секция «Энергоинформационные технологии»), Москва, 5-6 июня 2012; 42 Annual Meeting of European Environmental Mutagenic Society (EEMS), Польша, Варшава, 16-21 сентября 2012; IV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье. Молодые ученые за устойчивое развитие страны в глобальном мире», Москва, 27-28 сентября 2012; VIII международном симпозиуме «Экология человека и медико-биологическая безопасность населения», Венгрия-Австрия, 20-29 октября 2012; Пленуме Научного совета по экологии человека и гигиене окружающей среды «Актуализированные проблемы здоровья человека и среды обитания и пути их

решения», Москва, 12-13 декабря 2012; XVIII Всероссийском конгрессе «Экология и здоровье человека», Самара 8-10 октября 2013; IV съезде токсикологов России, Москва 6 – 8 ноября 2013; Пленуме Научного совета по экологии человека и гигиене окружающей среды РФ «Приоритеты профилактического здравоохранения в устойчивом развитии общества: состояние и пути решения проблем», Москва 12-13 декабря 2013; VIII Всероссийском форуме «Здоровье нации – основа процветания России», Москва, 18-20 июня 2014; V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье. Здоровая среда – здоровое наследие», Москва, 25-26 сентября 2014.

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

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 161 страницы компьютерного текста, содержит 43 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Слово «вода» неразделимо связано со словом «жизнь». «Вода является первой необходимостью для поддержания жизни, а удовлетворительное (адекватное, безопасное и в достаточном количестве) обеспечение водой должно быть доступно для всех людей. Улучшение качества и повышение степени безопасности питьевой воды может привести к ощутимой пользе для здоровья человека. Поэтому следует предпринимать все возможные усилия для обеспечения такого уровня безопасности питьевой воды, который практически достижим» [91]. Согласно Рекомендациям ВОЗ, СанПиН 1074 и СанПиН 1116 [91, 95, 96], питьевая вода не должна создавать никакого дополнительного риска для здоровья при употреблении ее в течение всей жизни. Вода – это самый распространенный продукт питания, продукт ежедневного и практически неконтролируемого потребления. Поэтому к воде должны предъявляться самые высокие санитарно-гигиенические требования [25].

Понятия качества и безопасности питьевой воды складываются из химической, биологической и радиологической безопасности. Методы исследования качества и безопасности воды по выше перечисленным показателям разработаны, эффективно используются и постоянно совершенствуются. Тем не менее, с развитием цивилизации в воде обнаруживаются все новые и новые антропогенные химические загрязнители, содержание некоторых из них нормируется и контролируется. В настоящее время в России существует устоявшаяся законодательная база для контроля качества и безопасности питьевых вод [26, 95, 96] и идет процесс гармонизации отечественных стандартов качества питьевой воды с зарубежными [55].

Помимо безопасности питьевой воды в последние десятилетия остро стоит вопрос о ее полезности, который рассматривается с точки зрения физиологической полноценности - содержания основных биологически необходимых макро- и микроэлементов. Впервые понятие полезности было введено для питьевой воды, расфасованной в емкости [96]. На основании этого

документа производителям питьевой бутилированной воды разрешается кондиционировать выпускаемую воду полезными для здоровья минеральными компонентами, такими как йод, фтор, селен, калий и др. Особенно важным с точки зрения профилактики фтор- и йоддефицитных заболеваний является выпуск питьевой бутилированной воды с добавками таких микроэлементов как йод и фтор [6, 88]. В настоящее время питьевая бутилированная вода становится альтернативой водопроводной воде, поскольку хлорирование, чаще всего используемое для обеззараживания воды в центральных системах водоснабжения, приводит к образованию токсичных галогенсодержащих хлорорганических соединений, которые обладают мутагенными и канцерогенными свойствами [127]. Употребление хлорированной воды связано с ухудшением здоровья населения [54, 61, 165, 120]. Поэтому для обеззараживания бутилированной воды при ее производстве запрещено использовать хлорирование, к бутилированной воде предъявляются более жесткие требования безопасности, чем к водопроводной воде [96]. Тем не менее, бутилированная вода на сегодняшний день доступна далеко не всем слоям населения страны, да и подчас возникают сомнения в качестве этого продукта.

Относительно недавно широкое распространение стали получать фильтрующие и сорбционные наноматериалы разного химического состава, которые предлагаются к использованию для обеззараживания и очистки питьевой воды. Следует отметить, что данные наноматериалы имеют физико-химические свойства, отличающиеся от свойств этих же веществ в молекулярной форме, что часто придает им каталитическую активность, на их поверхности при попадании в воду происходит образование активных форм кислорода. [66, 94]. Последние исследования доказывают опасность использования подобных фильтров для очистки воды, так как наночастицы из этих фильтров, попадая в воду и далее в организм человека, могут вызывать токсические [15] и генотоксические эффекты [143].

В последние десятилетия пристальное внимание ученых многих стран направлено на изучение физических свойств воды, ее структуры, биологической

активности и использование этих знаний для улучшения качества воды. С этой же целью изобретены различные способы активации воды, которые приводят к изменению ее физико-химических свойств, в частности, кластерной молекулярной структуры [89]. Наиболее распространенными современными методами физико-химического (энергоинформационного) воздействия на воду являются температурные, механические (вихревые, кавитационные), магнитные, электромагнитные (волновые), электрические (в т.ч. электрохимические), а также воздействие давления (краткий обзор этих методов приведен в приложении А).

Одним из самых распространенных способов активации воды является электрохимический. Недостатком контактной электрохимической активации, когда электроды помещены непосредственно в емкость с активируемой водой, является высокая опасность попадания в активируемую воду ионов тяжелых металлов, источником которых является материал электродов. При контактной электрохимической активации вода обогащается ионами, образующимися в процессе окислительно-восстановительных реакций, происходящих в воде под действием электрического тока. [7]. Поэтому для улучшения качества питьевой воды было предложено использовать неконтактную электрохимическую активацию (НА), для чего питьевая вода в тонкостенной полиэтиленовой емкости погружается в сосуд с контактно электрохимически активированной водой [7, 108, 114]. В результате происходит изменение физических параметров воды без изменения химического состава, хотя вода в полиэтиленовой емкости находится в нестабильном термодинамическом состоянии. [50]. Кроме того, в процессе неконтактной электрохимической активации у воды изменяются окислительно-восстановительный потенциал (ОВП), доля структурированной (связанной) фазы и другие физико-химические свойства [60, 100].

При создании приборов для активации воды сегодня может использоваться один или несколько методов активации. **Однако в РФ в настоящее время наибольшее распространение получили электрохимические активаторы**

(ионизаторы) воды отечественного и иностранного производства¹. В Интернете существует большое количество сайтов, предлагающих к продаже различные электрохимические активаторы воды стоимостью от нескольких тысяч до сотен тысяч рублей. Эти сайты пестрят информацией о лечебных эффектах получаемой в активаторах «живой» и «мертвой» воды. «Живую» воду (католит) предлагается употреблять без ограничений и использовать для лечения различных заболеваний, а мертвую (анолит) – для обеззараживания. Однако среди имеющихся, преимущественно, электронных изданий очень мало **научных** публикаций, отсутствуют подробные отчеты по проведенным исследованиям, доказывающих эффективность и безопасность применения этих вод и даже допускается не всегда строгая трактовка полученных данных. Так, например, в Интернете имеется много ссылок на работу японских ученых, которые «доказали» ДНК-протекторное действие редуцированной воды (католита) по отношению к радикалу супероксида [144]. В этой работе индуктором свободных супероксид-анион радикалов являлась перекись водорода, а защитное действие полученного электролизом католита оценивали по снижению числа одностранных разрывов суперскрученной плазмидной ДНК *in vitro*. Однако для демонстрации антиоксидантного действия католита в этих экспериментах его сначала добавляли к перекиси водорода, и только затем в полученный раствор вводили кольцевую суперскрученную ДНК. При такой постановке обнаруживалось большее количество суперскрученной ДНК, чем при действии перекиси водорода в отсутствие католита. На самом же деле, редуцированная вода не защищала ДНК от повреждения, а просто стабилизировала перекись водорода.

Краткий обзор доступных публикаций о биологических эффектах активности 47 различных активированных вод представлен в приложении Б. В частности, в этой таблице приведены данные о биологическом действии продуктов

¹ Они выпускаются как погружного, так и проточного типа. Проточные активаторы, как правило, монтируются в системы водоснабжения, с помощью погружных происходит обработка определенного объема воды. В активаторах погружного типа характеристики получаемых католита и анолита («живой» и «мертвой» воды) зависят от времени обработки. В активаторах проточного типа характеристики получаемых вод зависят от подаваемого на электроды напряжения и скорости потока воды.

электрохимической активации 21 воды, но только 2 публикации посвящены анализу биологической активности вод, полученных неконтактной электрохимической активацией.

Из всех изученных вод, для 10 вод была показана бактерицидная активность [20, 21, 49, 57, 58]. В тесте Эймса оценивали продукты активации 3 вод, и все они не проявили мутагенной активности [20, 35, 44, 98, 102, 121, 166], 4 воды после обработки не оказывали токсического действия на дафний и инфузорий [98].

На растительных объектах католиты на основе 4 образцов воды при удачно подобранном режиме (короткая экспозиция или разбавление католита) оказывали стимулирующее действие на прорастание семян, рост корней и урожайность растений [4, 5].

Продукты активации 2-х вод были испытаны на сперме быка – вредного действия не наблюдали и отмечали даже стимуляцию подвижности клеток [56, 81]. На растущих культурах клеток млекопитающих работы также единичны. «А-вода» не оказывала влияния на размножение нормальных клеток и угнетала рост раковых клеток [80], а воды с измененным содержанием дейтерия вызывали угнетение пролиферации, повышение чувствительности культивируемых лимфоцитов крови человека к мутагенному действию метилнитронитрозогуанидина, а в некоторых вариантах опытов – и повышение частоты клеток с микроядрами и нуклеоплазменными мостами [44, 121]. Однако частота aberrаций хромосом в культуре фибробластов китайского хомячка не повышалась после 6- и 24-часовой экспозиции в католите [166].

Больше всего работ было выполнено на животных *in vivo* – изучены последствия активации (в основном контактной электрохимической) 23 различных вод, причем более чем для половины из них оценивали не только собственно токсичность для интактных животных, но и влияние на протекание различных патологических процессов. Вредного действия не наблюдали на разных видах животных при однократном применении [70, 92], повторном в пределах недели [22, 49], месяца [1, 17, 56, 79, 81] и более [20]. Усиление иммунного ответа на введение эритроцитов барана было отмечено после

выпаивания мышам католита [56, 81], воды Ренорм [98, 30, 31, 32, 14, 102], а также мышам и крысам - воды Грандер (на основе «Стефании») [20, 98, 121]. Эта же вода при выпаивании крысам в течение 6 месяцев не вызывала повышения частоты клеток с микроядрами в костном мозге и эпителии преджелудка и мочевого пузыря [20, 98, 121]. Контактно активированная вода после 4-х недель выпаивания крысам вызывала увеличение прироста массы тела, повышение плодовитости и индекса беременности [17]. Неблагоприятными можно, пожалуй, счесть два наблюдения. При выпаивании католита и анолита самкам крыс в течение 3-х менструальных циклов перед беременностью, во время беременности и кормления у потомков наблюдали снижение прироста массы тела, отставание в физическом развитии и усиление тормозных процессов [17]. У цыплят бройлеров католиты с ОВП -550...-700 мВ и анолит 850-950 мВ вызывали выраженное угнетение пищеварительных ферментов, хотя при потреблении католита -225...-530 мВ наблюдали, наоборот, ускорение прироста массы тела, усвоения азота, жира, кальция, фосфора, повышение содержания в печени витаминов А и В₂ [56, 81].

Лечебное действие активированных вод было показано на разных моделях. Так, новорожденные телята излечивались от диареи за 2 дня с помощью анолита [49], активированные воды вызывали клиническое улучшение у крыс с аллоксановым диабетом [22, 156], у мышей с генетическим диабетом [151], у мышей и крыс при нефрите и остром цистите [17], у крыс с моделью скрытого дефицита железа [33, 63, 84, 85] и с гнойным артритом (анолит - внутрь сустава, католит р.о.) [86]. Католит р.о. повышал выживаемость мышей после рентгеновского облучения в смертельной дозе [56, 81], «А-вода» – после заражения вирусом гриппа или герпеса [80], анолит и католит р.о. – после введения смертельной дозы *E. Coli* или *S. typhimurium* [79] Католит повышал стрессоустойчивость крыс [16]. Католит при накожной аппликации крысам ускорял заживление ран, при этом увеличивалось включение меченого тимидина и ускорялась миграция клеток эпидермиса в область раны [56, 81]. Однако, усиление включения тимидина в энтероциты и гипертрофия ворсинок двенадцатиперстной кишки, наблюдавшиеся при введении того же католита крысам в желудок, вряд ли можно отнести к благоприятным

эффектам, поскольку способность усиливать пролиферацию является тем самым признаком, по которому принято выявлять канцерогены негенотоксического типа [134, 140].

С привлечением практически здоровых добровольцев были испытаны 7 образцов активированных вод, в том числе после электрохимической активации (контактной) – одна. В этой работе было показано, что через 30 мин после однократного приема 1 мл/кг массы тела воды у животных в эксперименте не изменялось артериальное давление [16]. Есть даже исследование, в котором по программе «Здоровье-Экспресс» нашли улучшение функций выделительной, репродуктивной, дыхательной и пищеварительной систем добровольцев, которое наступало в результате контакта руки испытуемого с бутылкой, наполненной водой «Аквагелиос» [23, 24]. Максимальная же длительность приема активированной воды р.о. составляла 6 месяцев (вода Туран). Тогда у школьников отмечали повышение оценки качества собственной жизни по опроснику Peds QL и снижение заболеваемости ОРВИ [33]. В большинстве же работ продолжительность курса приема воды составляла около 5 дней и авторы сосредоточивались в основном на оценке состояния слизистых оболочек ротовой полости и носа по биохимическим и цитологическим показателям, а иногда – и состояния желудочно-кишечного тракта. Во всех исследованиях нашли улучшение статуса слизистых и снижение воспалительных реакций в них [20, 75, 98].

Сообщения о применении активированных вод при различных заболеваниях человека носят несколько рекламный оттенок и режим их применения в публикациях, как правило, не указывается. Всего было оценено 11 вод, из них большинство – полученных с помощью неконтактной (1) и контактной (6) электрохимической активации. Прием воды после установки «Изумруд-СИ» снижал частоту возникновения панкреатита в послеоперационном периоде у онкологических больных [116]. Контактно активированные воды ускоряли лечение гнойных ран [28] и были даже эффективнее диоксидина в лечении гнойного артрита (анолит - внутрь сустава, католит – р.о.) [86], также улучшали

состояние больных после хронического гемодиализа [146], при хронической почечной недостаточности [56, 81], при хроническом парадонтите [1]. Вода «Ренорм» вызывала улучшение биохимического статуса у людей с сердечно-сосудистыми заболеваниями и у пациентов с ожирением, а также иммунного статуса – у онкологических больных [31, 32, 98]. В неврологической клинике успешно применялась вода «Туран» [33, 63]. Питьевая вода с пониженным содержанием дейтерия назначалась больным с сахарным диабетом 1 и 2 типа [103].

Поражает обрывочность всех приведенных выше сведений (а ведь это – практически вся доступная литература на данную тему). Если в целом эффекты анолитов можно в какой-то степени связать с их бактерицидностью, то действие католитов в большинстве случаев можно квалифицировать как биостимулирующее, но с двумя ограничениями. Во-первых, только узкий диапазон активации способен вызвать стимуляцию, а выход за пределы этого диапазона может дать противоположный эффект (вспомним опыты на растительных объектах и на цыплятах). Такой оптимальный режим производители приборов для электрохимической активации воды не указывают в инструкции, вероятнее всего, потому что он не отработан. Во-вторых, даже в случае выхода на оптимальный режим вызывает сомнение целесообразность, например, стимуляции пролиферации клеток в разных органах здорового человека.

Помимо вод, представленных в приложении Б, существует большое количество других коммерческих энергоинформационных вод российского и зарубежного производства, способ активации и физико-химические свойства которых в цитируемых источниках не приводятся, но не подтвержденные научными исследованиями лечебные свойства рекламируются на сайтах производителей. Несколько примеров (цитируем с сайтов производителей): структурированная вода с добавками соединений железа (концентрат) «Пи-вода «Tarama» (Корея), несколько капель которого «делают любую воду структурированной» [171]; активированная деструктурированная, низкоминерализованная питьевая вода «Божья роса» (Россия, Москва) [74]; концентрат намагниченной кластерной воды

«Cluster X2» (США) с гомеопатическими растительными добавками [51] и многие другие. К сожалению, более подробного описания свойств этих вод в доступной литературе найти не удалось.

Важно, что только для 5 технологий активации воды (среди которых нет ни одной, основанной на электрохимической активации) была проведена оценка биологических эффектов до их использования для лечения людей. Это активация воды силовыми полями с помощью прибора «Аквадиск», активация с помощью прибора Й.Грандера, технология подготовки питьевой воды «Ренорм», а также биогенная вода «Туран» и вода «Стефания», активированная с использованием технологии Й.Грандера.

Представленные в приложении Б данные по оценке генотоксических свойств противоречивы. Мы имеем:

- **отрицательные ответы** в тесте Эймса (продукты активации 3-х вод) [20, 98], в тесте на индукцию аберраций хромосом на культуре клеток фибробластов китайского хомячка (1 образец) [166] и в полиорганном микроядерном тесте на крысах в условиях 6- месячного выпаивания (1 образец) [14, 20, 98, 102];

- **положительный ответ** (индукция микроядер и нуклеоплазменных мостов, повышение чувствительности к мутагенному действию метилнитронитрозогуанидина) в микроядерном тесте на культуре крови человека (воды с измененным содержанием дейтерия) [44, 121].

Как видно из приложения Б, большинство из имеющихся исследований были направлены на изучение токсикологических свойств активированных вод, а генотоксические эффекты изучались в очень небольшом количестве исследований. Так, для питьевых вод с различным содержанием дейтерия биологическая активность была изучена в микроядерном тесте на клетках крови человека, культивированных в условиях цитокинетического блока [44]. В этой работе показано, что изменение содержания дейтерия сопровождалось торможением пролиферации клеток и повышением чувствительности генома к действию стандартного мутагена, причем минимальные эффекты были обнаружены в контрольной воде. Особо следует отметить, что в комплексных исследованиях

энергоинформационных вод «Грандер» и «Ренорм» был проведен полиогранный микроядерный тест в хроническом (6 месяцев) эксперименте на крысах [98]. В этой работе изучали и не обнаружили генотоксические эффекты в клетках костного мозга, эпителиальных клетках желудка и мочевого пузыря крыс. В то же время, при оценке генотоксических эффектов активированных питьевых вод с разной долей структурированной (связанной) фазы на клетках эпителия преджелудка крыс через 6 и 12 месяцев выпаивания в режиме *ad libitum* были обнаружены следующие цитогенетические нарушения: при выпаивании водой с низкой и высокой долями структурированной фазы (0, 553% и 0,746%) – повышение доли клеток с атипичной формой ядра, у вод с долей структурированной фазы 0,631% и 0,701% через 12 месяцев – увеличение частоты клеток с генетическими повреждениями [94]. Следует отметить, что эти исследования были проведены в ФГБУ «НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им А.Н.Сысина» МЗ РФ.

Анализ зарубежной литературы также обнаружил очень небольшое количество исследований генотоксичности активированных вод. Так в работе [166] изучали воду, электрохимически насыщенную водородом (нейтральный pH, ОВП = -150 мВ). Результаты этого исследования показали, что при 6-часовой экспозиции в тесте Эймса и в тесте на индукцию хромосомных aberrаций в культуре фибробластов легких китайского хомячка мутагенная активность обнаружена не была. Однако следует понимать, что тест Эймса в стандартной постановке позволяет вводить изучаемую воду в контакт с бактериями только в объеме 100 мкл в 2,5 мл агара (разведение в 25 раз), и, кроме того, требует нагревания среды до 47⁰С, что не может не отразиться на содержании водорода в изучаемой воде, а также на ее структуре, изменение которой возможно при насыщении водородом.

Учитывая все разнообразие способов активации воды, большое количество приборов и продуктов активации, следует заключить, что имеющихся исследований по оценке мутагенной/канцерогенной безопасности применения активированных вод на удивление мало. Оценка этих показателей является обязательной для всех факторов, вводимых в окружающую человека среду, и

особенно актуальна в случае широкого и непосредственного контакта с организмом человека.

Анализ литературы позволяет сделать три очень важных вывода:

1. Исследования биологической активности активированных вод в большинстве случаев носят фрагментарный характер, набор тестовых систем и живых организмов, использованных в большинстве работ, является случайным; случайным представляется и выбор медицинских показаний для использования активированных вод;

2. Вопрос о систематическом изучении отдаленных последствий применения активированных вод ранее не поднимался.

3. Представленные данные говорят о том, что в современной литературе до сих пор не сформировалось понимание необходимости систематической оценки безопасности активированных вод до их применения человеком.

Причина такого плачевного состояния этих исследований, на наш взгляд, заключается в имеющихся регламентах использования активаторов питьевой воды, в соответствии с которыми в прибор поступает питьевая вода, по компонентам химического состава и/или микробиологическим показателям удовлетворяющая условиям нормативной документации (хотя регламентированными для каждого прибора являются лишь очень немногие из показателей, нормированных для питьевых вод). Естественно, что на выходе из прибора вода также соответствует нормативной документации. В разрешительной документации, например, электрохимические активаторы называются «ионизаторами воды, служащими для очистки, обеззараживания, кондиционирования воды и придания ей антиоксидантных свойств» [106] или просто «ионизаторами для воды», которые могут применяться в хозяйственно-бытовом водоснабжении [72, 118], что по умолчанию не предполагает возможность каких-либо негативных эффектов и не побуждает потребителей требовать документы, подтверждающие безопасность активированных вод. Поскольку неконтактные электролизеры признаны менее опасными, чем электролизеры для контактной электрохимической активации [50], у

непрофессиональной аудитории (а это - большинство потребителей электрохимически активированных вод) это заключение может создавать иллюзию доказанности их безопасности. Часто производители активированных вод или приборов для активации ссылаются на запатентованные технологии, причем продукт такой водоподготовки позиционируют как лечебный или лечебно-профилактический, что, по сути, приравнивает его к лекарственным препаратам. Тем не менее, в разрешительной документации на эти энергоинформационные воды фигурирует определение «питьевая вода», и не приводится информация, подтверждающая их лечебные свойства.

В то же время, хорошо известно, что в процессе неконтактной электрохимической активации у воды изменяются ОВП, pH, степень структурированности и другие физико-химические свойства [60, 100], что оказывает влияние на процессы формирования, стабилизации и функционирования клеточных мембран, а также белков и ДНК [2]. С.И.Аксенов в книге «Вода и ее роль в регуляции биологических процессов» пишет «... уникальность роли воды проявляется не только в том, что она служит специфической средой для прохождения биологических реакций, но и в том, что она непосредственно воздействует на формирование и стабилизацию нативной структуры макромолекул биополимеров, биологических мембран и различных более сложных биологических образований. ...Вода непосредственно влияет на эффективность биологических реакций, причем результирующее изменение конформации белков и свободной энергии системы связано с одновременным изменением структуры водного компонента (изменением состояния воды), ... создавая предпосылки для их избирательности, ...причем не только на уровне макромолекул биополимеров, но и на мембранном, а также и на клеточном уровнях» [2].

Эти соображения позволяют предположить у неконтактно активированных вод наличие генотоксической активности, **что выводит на передний план гигиенических исследований создание системы экспериментальной оценки безопасности активированных вод, и – в особенности – изучение отдаленных**

(генотоксических) эффектов, ориентированное на безопасность как для ныне живущих, так и будущих поколений.

Бесконтрольная продажа и пропаганда использования в быту приборов для неконтактной электрохимической активации питьевых вод делает проблему оценки безопасности этих вод и технологий водоподготовки — в том числе, генотоксических эффектов — особенно актуальной.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Характеристика питьевых вод, использованных для неконтактной активации

Поскольку в инструкциях к приборам для получения неконтактно активированных вод нет указаний на качество и источник воды, подвергаемой активации, в работе для получения НАВ использовали несколько питьевых вод:

- московскую водопроводную воду (Рублевская водопроводная станция, р.Москва),
- осмотическую (обессоленную на установке обратного осмоса) артезианскую воду из скважины №11-99 (ЗАО «Чистая вода» г.Самара; эта вода служит основой для производства питьевой воды "Кристалльная" (выпускается в соответствии с 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"),
- 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").
- самарскую водопроводную воду (р.Волга)

Перед активацией воды готовили следующим образом:

- московскую и самарскую водопроводные воды пропускали через систему фильтров: механический полипропиленовый фильтр предварительной очистки, угольный фильтр и механический полипропиленовый фильтр тонкой очистки; отфильтрованную воду кипятили в течение 15 минут и затем отстаивали в закрытой емкости в течение суток. Самарскую водопроводную воду перед началом обработки отстаивали 3 дня;
- артезианскую воду очищали на установке обратного осмоса, 15 мин кипятили и отстаивали в закрытой емкости в течение суток;

- бутилированную воду «Пилигрим» стерилизовали пропусканием через одноразовые мембранные фильтры «GE Infrastructure Water & Process Technologies Life Science Microseparations PES с диаметром пор 0,22 мкм.

Химический состав исходных (неактивированных) вод, использованных для приготовления НАВ, показан в табл.2.1.

Таблица 2.1 Химический состав вод,
использованных для неконтактной (электрохимической) активации

Показатель	Единицы измерения	Московская водопроводная вода	Минеральная бутилированная вода «Пилигрим»	Артезианская осмотическая вода ²
рН	ед.	7,93	7,43	6,68
Общая минерализация	мг/л	234,0	155,37	18,71
Окисляемость перманганатная	мг/л	0,4	1,56	<0,02
Жесткость общая	°Ж	4,0	1,35	0,18
Кальций	мг/л	48,0	23,05	2,64
Магний	мг/л	19,0	2,43	0,73
Натрий+Калий	мг/л	4,0	18,06	1,6
Железо общее	мг/л	0,1	<0,1	<0,1
Железо 3+	мг/л	0,1	<0,1	<0,1
Железо 2+	мг/л	<0,1	<0,1	<0,1
Марганец общий	мг/л	<0,03		<0,03
Нитраты (по NO ₃) ⁻	мг/л	5,7		<0,1
Нитриты (NO ₂) ⁻	мг/л	<0,003		<0,003
Сульфаты (SO ₄) ²⁻	мг/л	11,7	23,28	8,71
Фториды (F ⁻)	мг/л	11,7		<0,1
Полифосфаты (PO ₄) ³⁻	мг/л	<0,01		<0,01
Азот аммонийный	мг/л	0,64		<0,1
Кремний	мг/л	4,0		<0,5
Щелочность	мг-экв/л	3,6	1,45	3,23
Бикарбонаты	мг/л	219,6	88,45	0,05

2.2. Неконтактная активация воды

Для получения НАВ готовили **контактно-активированные воды** - католит и анолит, необходимые для проведения неконтактной активации. Их получали на

² Результаты собственных исследований

модифицированном электрохимическом активаторе «Изумруд» (СЭЗ №77.99.34.485.Д.010314.06.10 от 29.06 2010) или его аналоге электрохимическом активаторе АП-2 при силе тока 20-60 мА и напряжении 60 мВ. Полученные таким образом католит и анолит набирали в две емкости по 5 литров каждая, в которых затем проводили бесконтактную активацию подготовленных вод.

Для **бесконтактной активации** (рис. 2.1) каждую из заранее подготовленных питьевых вод разливали по 300 мл в 4 стерильных полиэтиленовых герметично закрывающихся пакета (Nasco WHIRL-PAK, USA, толщина стенок 120 мкм). Три пакета с водой помещали в емкость с контактно-активированной **католитной** водой на 5, 20, 40, 60, 120 минут, 24 часа, четвертый - в емкость с контактно-активированной **анолитной** водой на 40, 120 минут, 24 часа.

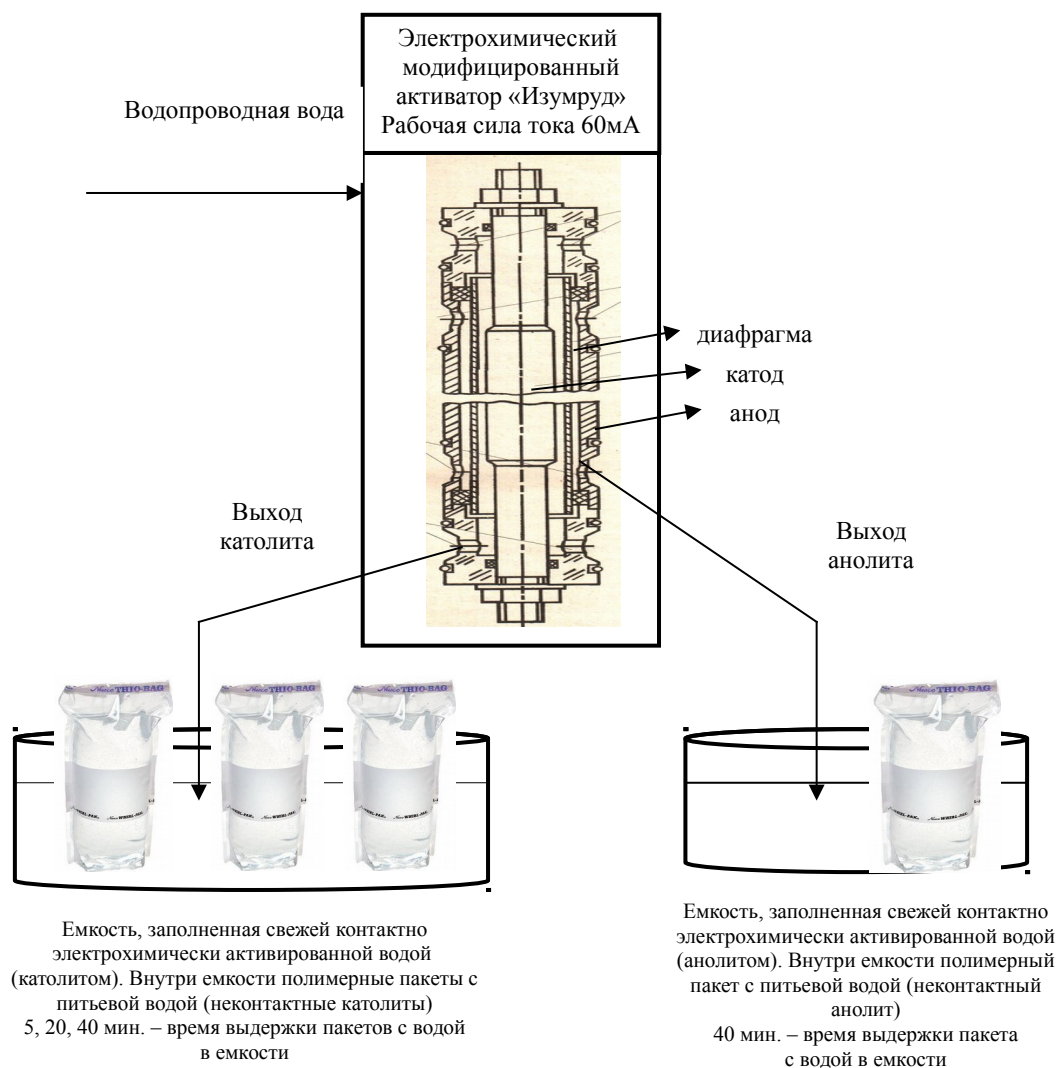


Рисунок 2.1 Схема неконтактной активации питьевых вод

По окончании экспозиции пакеты вынимали из емкости, воду переливали в стеклянную посуду для определения физико-химических свойств и использовали в биотестах.

2.3. Определение физико-химических показателей активированных вод

2.3.1. Определение водородного показателя, окислительно-восстановительного потенциала и электропроводности исследуемых вод

Водородный показатель, окислительно-восстановительный потенциал исследуемых вод определяли электрохимически с помощью рН-метра-иономера «Экотест-120» (ТУ 4215-004-41541647-2003, вторичный измерительный преобразователь - КДЦТ.414338.001, электроды – ТУ 4215-002-41541647-95 и ТУ 25.05.2181-77, температурный датчик – КДЦТ.418424.001). Электропроводность воды определяли на лабораторном кондуктометре WTW inoLab Cond 740 с датчиком TetraCon 325 №06120167 или портативном кондуктометре WTW Cond 330i с тем же датчиком.

Измерения ОВП проводили при комнатной температуре в 5-6 повторностях. В том же объеме воды измеряли рН и электропроводность.

2.3.2. Определение доли связанной (структурированной) фазы в воде

Сущность метода состоит в определении объема выделившегося газа при охлаждении воды до низких температур [93]. В морозильную камеру с постоянной температурой (-21°C) помещали стакан с этиловым спиртом и выдерживали до установления постоянной температуры. Образец воды наливали в стеклянный цилиндр и выдерживали перед анализом не менее 7 часов при комнатной температуре в темноте. Затем в эту воду погружали 20 капилляров Панченко объемом 0,1 см³ (ТУ 9443-005-52876351-02). Приблизительно через 15 минут из цилиндра вынимали по одному капилляру и устанавливали высоту столба

жидкости в нем на уровне 87-90 мм, (чтобы при кристаллизации объем жидкости не выходил за пределы шкалы) и фиксировали в дилатометрическом устройстве (рис. 2.2).

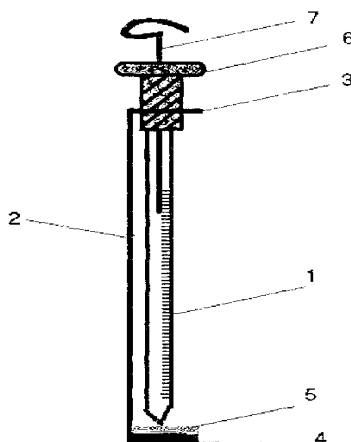


Рисунок 2.2 Дилатометрическое устройство (1 – капилляр Панченко; 2 – металлический держатель; 3 – верхняя площадка держателя; 4 - нижняя площадка держателя; 5 – резиновая прокладка; 6 – винт для фиксации капилляра; 7 – металлический зонд)

Дилатометрическое устройство с закрепленным в нем капилляром помещали под отсчетный микроскоп МПБ-2 (Авт.свидетельство №1442186, 8.08.1988) и регистрировали начальный объем (V_1) пробы воды с точностью $\pm 0,05$ мм. Далее каждое устройство с капилляром опускали в стакан со спиртом, находящийся в морозильной камере. После пятнадцатиминутного охлаждения устройство извлекали из морозильной камеры и в верхний конец капилляра вводили металлический зонд, продвигая его до упора в замерзшую пробу. Поочередно устройства снова помещали под микроскоп и по нижнему срезу зафиксированного зонда регистрировали объем замерзшей пробы (V_2). Чувствительность определения - 0,001%, погрешность измерения - не более 0,001%.

По полученным значениям величины начального и конечного объемов пробы, рассчитывают долю структурированной фазы в воде (q_{ac}^o), в измерительном капилляре:

$$q_{ac}^o = \frac{V_2 - V_1 / 0.93}{V_1 * K_{эс} * K_n}, \quad (1)$$

где V_1 - исходный объем воды в капилляре с учетом температурной поправки;

V_2 – суммарный объем льда с газовыми включениями;

$K_{жс}$ – коэффициент сжатия воздуха в структурированной фазе воды

($K_{жс} = V_{газа \text{ при } 1 \text{ атм}} / V_{газа \text{ при } 2000 \text{ атм}} = 24,28$);

$K_n = 0,21$ – доля пустот в объеме связанной воды.

Для расчета процента структурированной фазы в объеме определяют среднее арифметическое значение доли структурированной фазы в воде, находящейся в 10 измерительных капиллярах:

$$M_{ni} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n q_{ac}^o, \quad (2)$$

где n – количество измерений доли структурированной фазы в воде, находящейся в 10 измерительных капиллярах (для каждой повторности).

Далее определяют среднеарифметическое значение доли структурированной фазы в воде на основании 3-х повторностей. Среднеарифметическое значение структурированности воды используют для расчета среднеквадратического отклонения (σ).

Вариабельность показаний, определяемая как отношение средне-квадратичного отклонения к среднему содержанию связанной воды в пробе, рассчитывается как:

$$Var = \sigma / q_{ac}^o, \quad (3)$$

где: Var - вариабельность показаний;

σ - стандартное отклонение.

Расчет процентного содержания структурированной фазы в объеме от 0,1 см³ пробы проводят по формуле с использованием расчетных коэффициентов квадратичного уравнения - $a=267$; $b=0.186$; $c=0,00012$:

$$q_c^o = (a * (q_{ac}^o)^2 - b * q_{ac}^o + c) * 100, \% \quad (4)$$

Полученные значения приводят к нормальным температурным условиям, учитывая зависимость структурированности воды от температуры q^t :

$$q^t = q^{20} [1 + 0,197 (t - 20)], \quad (5)$$

где q^{20} – структурированность воды при 20°C.

За окончательный результат измерения принимают среднее арифметическое значение результатов трех параллельных измерений, выполняемое до третьего десятичного знака. Вычисляют среднее значение структурированной фазы в объеме (в процентах):

$$M q_c^o = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n q_c^o, \quad (6)$$

где n – количество измерений структурированной фазы в объеме воды;

q_c^o – среднее значение процентного содержания структурированной фазы в объеме воды.

Рассчитывают относительную разницу результатов трех параллельных измерений одной пробы:

$$|M_1 - M_n| \leq 0.01 * d * \bar{M}, \quad (7)$$

где d – оперативный контроль сходимости, 5 % $\bar{M}$.

По данным измерений 10 капилляров на основании численных значений структурированности для каждого капилляра заполняют таблицу энергетического состояния образца воды (табл.2.2).

Таблица 2.2 Энергетическое распределение структурированной (связанной) фазы в воде

Доля связанной (структурированной) фазы в воде, Δq , %	Количество капилляров в каждом диапазоне
0,0...0,1	
0,101...0,2	
0,201...0,3	
0,301...0,4	
0,401...0,5	
0,501...0,6	
0,601...0,7	
0,701...0,8	
0,801...0,9	
0,901...1,0	
Более 1,01	

2.3.3. Определение светосуммы люминол-геминовой хемилюминесценции

Метод основан на регистрации задержанного во времени хемилюминесцентного свечения гемин – люминольного реагента при добавлении в него анализируемого образца воды. Сущность метода состоит в раздельном

определении активных свободно–радикальных и ион-радикальных форм кислорода в воде и возможности оценки стабильности ее структурированной фазы по кинетическим зависимостям хемилюминесценции образца [19].

Чувствительность метода составляет 10^{-7} г/л по перекиси водорода. Определению не мешает наличие в воде химических загрязнителей. Методика обеспечивает выполнение измерений с погрешностью $\pm 10\%$.

Измерения проводили при комнатной температуре. Хемилюминометр (хемилюминесцентный анализатор жидких проб ЛИК-2) калибровали разбавленными в дистиллированной воде растворами перекиси водорода. Перед измерениями растворы слегка перемешивали без встряхивания и оставляли в затемненном (но не в темноте) месте на 20 часов.

100 мкл гемин – люминольного реагента (8 мг/л гемина в щелочном растворе люминола, ГО 33.10.000.01) не разбрызгивая по стенкам кюветы, помещали в измерительную кювету прибора. Кюветное отделение закрывали крышкой дозатора, в которую вносили 50 мкл анализируемой воды или калибровочного раствора так, чтобы капля не касалась боковых стенок дозатора, закрывали выдвижную крышку кюветного отделения и резко нажимали на крышку для быстрого ввода пробы в реагент (чтобы не исказить кинетическую кривую хемилюминесценции время нажатия не превышало 0,2 сек). После окончания счета фиксировали светосумму люминесценции (Σ), амплитуду (A_m) и время выхода максимума хемилюминесценции (t_m). Через 10 секунд после окончания основного счета вновь нажимали на крышку и регистрировали показания прибора 2-го цикла измерений. Каждую пробу измеряли 3-5 раз.

2.3.4. Определение химического состава исходных и неконтактно активированных вод

Для оценки возможной миграции примесей, содержащихся в контактно активированных водах внутрь пакета, в котором воды получались

неконтактной активацией, равно как и миграции мономера, пластификатора и пр. веществ, являющихся компонентами материала пакета за время неконтактной активации (5-40 мин) были проведены химико-аналитические исследования, ориентированные на идентификацию и количественное определение методами ионной хроматографии в соответствии с ГОСТ 31867-2012 «Вода питьевая. Определение содержания анионов методом хроматографии и капиллярного электрофореза», ПНД Ф 14.2:4.176-2000 (издание 2014 г.) «Методика определения содержания анионов (хлорид-, сульфат-, нитрат-, бромид- и йодид-ионов) в природных и питьевых водах методом ионной хроматографии», МВИ ЗАО «Аквилон» (атт. Свид. № 18-08 от 04.03.2008 г.). Анализ на содержание катионов проводили в соответствии с ГОСТ 31869-2012 «Вода. Методы определения содержания катионов (аммония, бария, калия, кальция, лития, магния, натрия, стронция) с использованием капиллярного электрофореза». Анализ на содержание органических веществ в воде выполнены хромато-масс-спектрометрическим методом, позволяющим надежно идентифицировать и количественно определять с чувствительностью на уровне и ниже гигиенических нормативов широкий спектр органических веществ C1-C40 в воде с неизвестным составом загрязняющих веществ на - хромато-масс-спектрометре Focus GC с DSQ II (США) (Свидетельство о поверке № 5345-10 от 08.07.2010 г.). Измерения выполнены в лаборатории физико-химических исследований НИИ ЭЧиГОС им. А.Н Сысина (рук. проф. А. Г. Малышева) в соответствии с действующими методическими документами по контролю органических веществ: ГОСТ Р ИСО 16000-6-2007.

2.4. Оценка нестабильности генома на культуре клеток крови человека

Под нестабильностью генома принято понимать «весь комплекс изменений, характеризующих трансформацию генома нормальной клетки здорового организма в геном, характерный для клеток опухоли» [169], что включает генетические повреждения, изменение пролиферации, частоты апоптоза и другие проявления.

Микроядерный тест *in vitro* основан на культивировании лимфоцитов или цельной венозной крови человека и/или животных в присутствии цитохалазина В, создающего условия для блока цитокинеза [160].

2.4.1. Проведение исследования в реконструированных средах

Венозную кровь молодого здорового некурящего донора (2-5 мл) отбирали в гепаринизированные (5000 МЕ/мл) одноразовые шприцы, которые после смены иглы хранили в холодильнике в течение суток.

Реконструированные среды для культивирования готовили в стерильных условиях следующим образом: в стандартную навеску сухой среды RPMI-1640 (ПанЭко, РФ), рассчитанную на приготовление 2,0 л жидкой среды, добавляли стерильный раствор 7,5% бикарбоната натрия в соответствии с прописью фирмы. Затем 0,13 мл этого раствора доводили тестируемой водой до 5,0 мл (физико-химические свойства вод, использованных для приготовления реконструированных сред, определяли непосредственно перед приготовлением сред для культивирования клеток).

Состав среды для культивирования клеток: 3,0 мл реконструированной среды, приготовленной на изучаемой воде, помещали в стерильный пенициллиновый флакон объемом 10 мл, добавляли 0,8 мл инактивированной сыворотки крупного рогатого скота, 0,2 мл цельной венозной крови, 30 мкл ФГА (1,0 мг/мл) в стерильном физиологическом растворе и 10 ЕД/мл смеси пенициллина со стрептомицином, приготовленном на стерильном физиологическом растворе.

Параллельные пробы крови культивировали в:

- реконструированной среде на исходной неактивированной воде;

- стандартной жидкой среде RPMI-1640 (ПанЭко, РФ).

Для исключения энергоинформационного влияния воды одной культуры на другие, культуры, приготовленные из разных НАВ, располагали в разных термостатах ($t=37^{\circ}\text{C}$).

На 44 часу в культуру вводили раствор цитохалазина В (ПанЭко, РФ) в ДМСО (конечная концентрация 6 мкг/мл) [40, 138].

Для каждой серии опыта и контроля ставили параллельные культуры, в которые на 24 часу от начала культивирования добавляли стандартный мутаген N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин (МННГ) в конечных концентрациях 3 и 6 мкг/мл [69].

2.4.2. Фиксация клеток

Фиксацию проводили на 72 часу от начала культивирования. Клетки переносили в стеклянные конические центрифужные пробирки объемом 10 мл и центрифугировали 10 мин на бакет-роторе при скорости 1000 об/мин. Надосадок отсасывали с помощью водоструйного насоса, осадок осторожно взбалтывали мягкими ударами пальца о пробирку и в эту пробирку приливали 5 мл холодного раствора хлорида калия (0,93 г/100 мл). Пробирку закрывали пробкой и мягко поворачивали вокруг оси в течение 40-45 сек. После этого в пробирку аккуратно по стенке приливали 1,0 мл холодного фиксатора (метанол-ледяная уксусная кислота 3:1 v/v), закрывали пробкой, несколько раз аккуратно переворачивали и помещали в холодильник. Через 20 минут процедуру повторяли в том же режиме, в суспензию клеток по стенке приливали 5,0 мл холодного фиксатора и оставляли в холодильнике. Не менее чем через 20 минут всю процедуру смены фиксатора повторяли еще раз, после чего клетки оставляли в свежей порции фиксатора на ночь в холодильнике. Последнюю смену фиксатора проводили утром, после чего клетки суспендировали в 0,5 мл холодного фиксатора, тщательно пипетировали и по 5-7 капель наносили на холодные предметные стекла. Стекла сушили на воздухе, окрашивали красителем Романовского (ПанЭко, РФ) и шифровали.

2.4.3. Цитогенетический анализ

Цитогенетический анализ [41, 42, 128, 137, 138] проводили с помощью световых микроскопов Leica 1000 и Carl Zeiss YenaVal в проходящем свете при увеличении 10 x 100 (масляная иммерсия, матовый светофильтр).

Для анализа на препаратах выбирали поля зрения, на которых все клетки лежали отдельно, имели цитоплазму с четкой границей, и в каждой клетке можно было подсчитать количество ядер и определить ядерные аномалии. Все поля зрения, не соответствующие этим критериям, пропускали. Клетки без цитоплазмы не анализировали.

Микроядра идентифицировали как лежащие в цитоплазме четко отдельные от ядер округлые хроматиновые тела с непрерывным гладким краем размером не более 1/4 диаметра ядра.

Микроскопический анализ проводили следующим образом: при подсчете 500 клеток определяли спектр клеточных популяций: количество клеток в митозе, клеток с 1, 2, 3, 4 и более ядрами. При этом учитывали повреждения (нуклеоплазменные мосты - НПМ и микроядра - МЯ) в них, а также клетки в состоянии апоптоза. Затем на других участках стекла анализировали только двуядерные клетки с четкой цитоплазмой и отдельно лежащими ядрами, в которых отмечали количество и тип МЯ, НПМ, а также клетки, в которых ядра находились в разных стадиях клеточного цикла. В совокупности двух просмотров на каждом стекле насчитывали 1000 двуядерных клеток.

Такой анализ позволил определять показатели, характеризующие:

- генотоксические эффекты: частоты 2-ядерных клеток с МЯ (отдельно с 1-, 2-, 3- и большим числом МЯ, а также клеток с МЯ типа «разбитое яйцо» и с НПМ), частоты 3-ядерных клеток с микроядрами и с НПМ, частоты 4-ядерных клеток с МЯ и с НПМ, частоты полиядерных клеток с микроядрами и с НПМ;

- пролиферативную активность клеток: спектр делящихся клеток, пролиферативный пул, индекс репликации ядер, индекс пролиферации, долю ускоренно делящихся клеток (имевших на момент фиксации более 2 ядер), долю асимметрично делящихся клеток во втором митозе (по соотношению частот клеток с 3 и 4 ядрами);

- митотический индекс;

- частоту апоптоза;

Дополнительно для каждой культуры рассчитывали:

- пролиферативный пул - как сумму клеток в состоянии митоза и клеток с 2-, 3-, 4- и большим числом ядер,
- долю (%) делящихся клеток с генетическими повреждениями - микроядрами (МЯ) и нуклеоплазменными мостами (НПМ),
- объем фракции ускоренно делящихся клеток в спектре клеточных популяций - как сумму клеток, образовавшихся в результате 2 и большего числа митотических циклов (клеток с 3-, 4- и большим числом ядер) (%),
- объем фракции ускоренно делящихся клеток с генетическими повреждениями (микроядрами и нуклеоплазменными мостами) (%),
- степень асимметрии деления клеток во втором митотическом цикле – как соотношение частот 3-ядерных и 4-ядерных клеток;

Основными показателями *цитотоксического* действия считали индекс репликации, характеризующий процессы удвоения ДНК [172]:

$$ИР = [(1 \times \% \text{однойдерных кл}) + (2 \times \% \text{двухдерных кл}) + (3 \times \% \text{3-ядерных кл}) + (4 \times \% \text{4-ядерных кл})] / 100 \quad (8)$$

и индекс пролиферации [164]:

$$ИП = [(1 \times \% \text{однойдерных кл}) + (2 \times \% \text{двухдерных кл}) + \{3 \times \% \text{3-ядерных кл} + \% \text{4-ядерных клеток} + \% \text{полиядерных клеток}\}] / 100 \quad (9)$$

И чувствительность к действию мутагена по всем показателям оценивали как отношение эффекта мутагена к фоновому уровню. Всего на каждом цитогенетическом препарате анализировали 1300-1500 клеток.

2.4.4. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных по всем параметрам в этом тесте проводили в стандартном пакете компьютерных программ Statistica 6.1 с использованием одностороннего критерия X^2 с использованием корреляционного и регрессивного анализов. Значимыми признавали различия при $p \leq 0,05$. По возможности использовали односторонний критерий как наименее консервативный, имеющий намного меньшую вероятность ошибки второго рода, чем соответствующий двусторонний и облегчающий установление зависимости [36].

Заключение о наличии (отсутствии) влияния активированных вод на показатели нестабильности генома клеток крови человека делали по:

- результатам сравнения с интактным контролем по всем указанным параметрам (типу – частоте МЯ и/или НПМ мостов и степени выраженности эффекта);
- наличие и характеру зависимости эффекта от продолжительности активации воды;
- коэффициентам β регрессионных уравнений, которые характеризуют нарастание эффекта на единицу воздействия (изменения продолжительности активации воды, параметров структурированности воды, ОВП, светосуммы хемилюминесценции).

2.5. Оценка частоты aberrаций хромосом в клетках костного мозга мышей

Хромосомные aberrации и события, с ними связанные, являются причиной многих генетических заболеваний человека. Кроме того, доказано, что мутации,

проявляющиеся как абберрации хромосом, связаны с изменениями в онкогенах и генах-супрессоров опухолей, следовательно, являются одной из причин возникновения опухолей как у человека, так и у лабораторных животных.

Тест на индукцию хромосомных аббераций в клетках костного мозга лабораторных грызунов *in vivo* рекомендован в России и странах ОЭСР [161] для оценки генетической безопасности химических соединений и их смесей (в том числе, лекарственных препаратов), радиации и других факторов окружающей среды.

В основе метода лежит регистрация видимых структурных нарушений хромосом в клетках на стадии метафазы.

2.5.1. Животные

В эксперименте были использованы конвенциональные животные - 120 двухмесячных самцов мышей F1 (СВАхС57В1/6) с массой тела 20-24 г., по 6 особей в группе. Производитель животных: Научный центр биомедицинских технологий РАМН, филиал «Андреевка». Животные разведены специально и ранее не участвовали в исследованиях. Производитель предоставил данные (ветеринарное свидетельство) последнего контроля состояния здоровья животных и сертификат на партию гибридных мышей F1(СВАхС57В1/6) для проведения данного исследования.

Подбор животных в группы осуществляли методом «случайных чисел», используя в качестве критерия массу тела. Индивидуальное значение массы тела не отклонялось от среднего значения в группе более чем на 10%.

Мышей содержали в поликарбонатных клетках по 6 особей. В качестве подстила использовали стерилизованные древесные опилки. Мышей содержали отдельно от других видов животных в индивидуальной комнате при температуре воздуха 18-22°C, относительной влажности 40-60% и естественно-искусственном освещении.

Рацион животных составлял стандартный гранулированный полнорационный комбикорм для лабораторных животных ПК-120 ГОСТ

Р 51849-2001 Р.5 (ООО «Лабораторкорм», Россия), который давали *ad libitum* в кормовое углубление клетки.

Ежедневно каждая группа животных получала *ad libitum* свежеприготовленные экспериментальные и контрольные воды на основе московской водопроводной воды, очищенной с использованием системы фильтров (угольный фильтр, фильтр тонкой очистки) и неконтактно (электрохимически) активированной. Контрольные группы потребляли отстоянную и свежее профильтрованную московскую водопроводную воду. Объем выпитой воды в каждой поилке фиксировали после ее смены в поилке.

Физико-химические свойства вод, использованных для выпаивания животных, определяли дважды - в начале и в конце эксперимента.

Эвтаназию животных осуществляли цервикальной дислокацией через сутки после начала выпаивания, а затем через 8, 15 и 30 суток.

2.5.2. Цитогенетический анализ

Цитогенетический анализ частоты aberrаций хромосом основан на регистрации видимых структурных нарушений хромосом в клетках, находящихся на стадии метафазы.

Для накопления клеток в стадии метафазы за 1 час 45 мин до эвтаназии цервикальной дислокацией мышам внутрибрюшинно вводили колхицин (0,025% рабочий раствор) по 0,01 мл/г массы животного. Костный мозг из бедренных костей только что забитых мышей вымывали в центрифужную пробирку 1 мл гипотонического (0,555%) раствора KCl, прогретого до 37°C. Костный мозг инкубировали 10 минут в присутствии KCl при 37°C, центрифугировали в течение 5 минут при 1000 об/мин на центрифуге ЦЛН. Надосадочную жидкость осторожно сливали, на осадок наслаивали 1 мл свежеприготовленного холодного фиксатора (3 части метанола и 1 часть ледяной уксусной кислоты) и помещали на 20 минут в холодильник. После этого, не взбалтывая осадок, фиксатор сливали, в пробирки добавляли новую порцию холодного фиксатора того же объема и

выдерживали в холодильнике не менее 20 минут. Клетки в третьей порции свежего фиксатора оставляли в холодильнике на ночь. Затем пробирки центрифугировали 5 минут при 1000 об/мин на центрифуге ЦЛН, фиксатор сливали, осадок разбивали мягкими ударами пальца о пробирку и добавляли 0,5 мл фиксатора. Полученную суспензию аккуратно пипетировали и раскапывали на чистые мокрые (холодная вода) предметные стекла, которые подсушивали над пламенем спиртовки.

Препараты окрашивали азур-эозином по Романовскому и шифровали.

На каждое животное анализировали по 100 метафазных пластинок на каждое животное. Для анализа отбирали метафазные пластинки правильной формы, с хорошим разбросом хромосом и числом хромосом 40 ± 2 . Учитывали следующие типы aberrаций хромосом: фрагменты (одиночные, парные и клетки с множественными aberrациями), хроматидные и хромосомные обмены. При наличии в клетке более пяти aberrаций ее классифицировали как имеющую множественные aberrации. Ахроматические пробелы (гепы - одностреччатые участки в двунитевой молекуле ДНК), определяемые визуальными нарушениями целостности окраски хроматиды, не превышающие по размеру ее ширины и не сопровождающиеся сдвигом дистального участка относительно ее оси [9] оценивали отдельно и не включали в общее число aberrаций.

2.5.3. Статистический анализ

Статистический анализ полученных данных проводили на каждый срок забоя животных отдельно путем сравнения между опытными и контрольными сериями по критерию соответствия χ^2 . Значимыми признавали различия при $p \leq 0,05$. Использовали односторонний критерий как наименее консервативный, имеющий намного меньшую вероятность ошибки второго рода, чем соответствующий двусторонний и облегчающий установление зависимости [36].

2.5.4. Оценка результатов

Оценку результатов цитогенетического анализа проводили путем сопоставления долей клеток с хромосомными aberrациями в контрольных и опытных сериях эксперимента. Частоту клеток с гемами использовали в качестве дополнительного критерия цитогенетической активности.

2.6. Оценка частоты доминантных летальных мутаций в половых клетках дрозофилы

В экспериментах использовали мух вида *Drosophila melanogaster* линии Д-32 из коллекции Института биологии развития им. Н.Кольцова РАН, которая обладает низкой спонтанной мутабельностью [59]. Линию поддерживали в лаборатории генетического мониторинга ФГБУ «НИИ ЭЧиГОС им А.Н.Сысина» МЗ РФ в соответствии с [62].

Работу проводили в тесте на индукцию доминантных летальных мутаций (ДЛМ) в половых клетках самцов дрозофилы [39, 59, 64, 83, 126].

Метод основан на учете генетических повреждений в сперматозоидах самцов-родителей, которые приводят к гибели потомка на стадии яйца, развивающегося из зиготы, оплодотворенной таким сперматозоидом [176, 177]. Более 50% белков дрозофилы гомологичны соответствующим белкам млекопитающих [53]. Тест замечателен высокой чувствительностью, простотой исполнения, экономичностью, уникальной возможностью изучать очень большие выборки эукариотических организмов, что выгодно отличает его от большинства токсикологических тестов и рекомендован для прогноза канцерогенов [90].

Основными показателями ДЛТ являются превышение частот ранней (РЭЛ) и поздней (ПЭЛ) гибели эмбрионов над контролем. Генотоксическую активность учитывают по превышению над контролем частоты ПЭЛ. Образование РЭЛ происходит не только в результате мутаций, но и при возникновении некоторых токсических эффектов, таких как эффективность спаривания и повреждения сперматозоидов в результате неучитываемых физиологических изменений. Кроме

того, к нарушению развития зиготы приводят повреждения хромосом или их утрата, а также точковые мутации. Для определения этих повреждений определяют долю (%) погибших зигот среди отложенных яиц.

2.6.1. Постановка эксперимента и анализ результатов

Все исследования проводили в зашифрованном виде.

В эксперименте использовали неконтактно активированные воды, приготовленные на отстоянной и фильтрованной московской водопроводной воде сразу после активации.

В каждом образце активированной и контрольной воды непосредственно перед экспозицией самцов растворяли сахарозу до получения 5% раствора. Молодых самцов дрозофилы (50 особей на группу), помещали в стеклянные фильтры Шота, закрытые пробкой, пропускающей воздух. Фильтры погружали в изучаемые воды, которые сменяли каждые 24 часа. Продолжительность экспозиции – 48 часов. После окончания экспозиции самцов массово скрещивали с молодыми девственными самками линии Д-32 в соотношении 1 самец : 2 самки (в течение 6 часов). После скрещивания самок отсаживали в специальные домики для откладки яиц, дном которых служили сменные кюветы с «голодным» кормом [62]. В норме личинки дрозофилы вылупливаются из яиц не более чем через 12 часов, что обуславливает регламент постановки эксперимента: кюветы под домиками сменяли каждые 12 часов (яйца, отложенные за первые 12 часов, не анализировали, поскольку среди них могло быть много неоплодотворенных яиц). После смены кювет в них сразу подсчитывали количество отложенных яиц, после чего помещали во влажные камеры (24⁰С), в которых вылуплялись личинки. На 48 часу от начала кладки кюветы еще раз просматривали для учета неразвившихся яиц. Яйца, не изменившие первоначального вида, регистрировали, как РЭЛ, а яйца, приобретшие все оттенки желтой или коричневой окраски – как ПЭЛ. Результаты расшифровывали после окончания всего эксперимента.

Всего было проведено 5 повторностей эксперимента.

2.6.2. Статистическая оценка результатов

Статистическую оценку результатов проводили для каждой группы отдельно путем сравнения между опытными и контрольными сериями по критерию соответствия χ^2 . Значимыми признавали различия при $p \leq 0,05$. По возможности использовали односторонний критерий как наименее консервативный, имеющий намного меньшую вероятность ошибки второго рода, чем соответствующий двусторонний и облегчающий установление зависимости [36].

2.7. Оценка влияния неконтактно активированных вод на жизнеспособность бактерий

Для оценки влияния НАВ на жизнеспособность бактерий были использованы 2 вида тест-культур: лиофилизированные бактерии E.Coli (музейный штамм № 1257, ФГБУ «ГИСК им. Л.А.Тарасевича») и лиофильно-высушенные споры B.cereus IP 5832 (бактерии входят в состав капсул препарата «Бактисубтил», регистрационный номер П NO12671/01 от 18.02.2008, Лаборатория Авентис, Франция).

В эксперименте были использованы следующие питательные среды для культивирования микроорганизмов:

- ГМФ-агар - питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой на основе гидролизата говяжьего мяса ферментированного (РУ № ФСР 2010/06966, производитель «Научно-исследовательский центр фармакотерапии», г.Санкт-Петербург);

- Среда БНТ-Эндо-агар для выделения энтеробактерий и их дифференциации по признаку ферментации лактозы, сухая (РУ № РЗН 2013/699, производитель ООО «Биотехновация», г.Электрогорск);

- ГРМ-бульон - питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой (РУ № ФСР 2007/00002, ФГУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, г.Оболенск);

- Селективная диагностическая среда для выделения и идентификации *B.cereus* в продуктах питания *Bacillus cereus* Medium PEMBA (Рег.№ 126339/135, производитель Lab M Limited, UK).

Для приготовления разведений бактериальной суспензии был использован отраслевой стандарт мутности ОСО 42-28-85 (10МЕ) (производитель ФГБУ «ГИСК им. Л.А.Тарасевича»).

Бактериальные культуры восстанавливали из лиофилизированного состояния с помощью питательного бульона. Суточную культуру пересевали на селективные среды (*E.Coli* на агар Эндо, *B.cereus* на PEMBA), через сутки выросшие колонии идентифицировали. Одиночную типичную колонию пересевали на скошенный питательный агар для получения рабочей культуры. Из суточной рабочей культуры готовили стандартные разведения [48].

Разведения бактериальной культуры до 10^5 включительно готовили в физиологическом растворе при соотношении со стандартным образцом мутности. Дальнейшее разведение (10^4 - 10^2) клеток в 1 мл готовили в стерильных неконтактно (электрохимически) обработанных осмотической артезианской и водопроводной водах (г.Самара). Для приготовления разведений в контроле использовали стерильную необработанную осмотическую артезианскую и водопроводную воду.

Полученные бактериальные разведения в течение 2 и 24 часов выдерживали при 37 °С и высевали на 2 параллельные чашки Петри с неселективным питательным агаром в объеме 0,1 и 0,05мл методом прямого поверхностного посева. Подсчет выросших типичных колоний проводили через 24 часа инкубации

при 37 °С. За результат принимали среднее значение на двух параллельных чашках.

2.8. Объем проведенных исследований

Общий объем проведенных исследований показан в табл. 2.3.

Таблица 2.3. Объем проведенных исследований

Изучены биологические эффекты	53 образца воды
Измерений физико-химических параметров	более 280
Количественный анализ состава московской водопроводной воды и активированных вод, полученных на ее основе	13 образцов воды
В микроядерном тесте на культуре клеток крови человека по 33 показателям проанализировано	19 образцов воды, более 42 000 клеток
В тесте на индукцию доминантных летальных мутаций в половых клетках самцов дрозофилы проанализировано	5 образцов воды, 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, более 10000 более 130000
Микробиологические эксперименты проведены на E.Coli 1257 (лиофилизированный штамм) и B.Cereus IP 5832	24 образца воды, 540 определений
Всего проанализировано	более 188000 единиц информации

ГЛАВА 3. АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ НЕКОНТАКТНО АКТИВИРОВАННЫХ ВОД НА ОСНОВЕ ОСМОТИЧЕСКОЙ ВОДЫ НА ПОКАЗАТЕЛИ НЕСТАБИЛЬНОСТИ КЛЕТОК КРОВИ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

3.1. Спонтанные эффекты

Отработку режима активации проводили на клетках крови человека, культивированных в реконструированных средах, что позволило существенно ускорить и удешевить анализ по сравнению с экспериментами на животных.

Подготовленную стерильную воду экспонировали в контактно активированных водах 60 мин и 24 часа. Общая характеристика физико-химических свойств исходной воды и НАВ показана в табл. 3.1.

Таблица 3.1. Общая характеристика физико-химических свойств неконтактно активированных вод на основе осмотической воды

	Условия активации: сила тока (при получении контактно активированных вод) и время активации (при получении неконтактно активированных вод)	Окислительно-восстановительный потенциал ОВП, мВ	Водородный показатель рН, усл.ед	Электропроводность S, мкСм/см	Светосумма хемилюминесценции *10 ⁴ , усл.ед	Доля структурированной (связанной) фазы в воде, q	
						Среднее, %	Вариация Var
Контроль		325,9	6,70	23,0	5,46	0,088	0,235
Катоды	60 мА час	- 61,7	7,20	25,1	1,58	0,234	0,038
	40 мА час	- 39,9	7,20	25,1	2,47	0,202	0,053
	20 мА час	9,6	7,07	25,3	3,67	0,175	0,051
	40 мА сутки	113,7	7,00	22,1	2,64	0,168	0,052
	20 мА сутки	149,2	6,81	24,2	4,25	0,124	0,202
	60 мА сутки	206,0	7,19	22,0	1,72	0,143	0,062
Аноды	60 мА час	346,4	6,40	26,7	2,85	0,11	0,178
	60 мА сутки	360,8	6,19	22,2	1,91	0,226	0,446

Результаты оценки эффектов нестабильности генома в реконструированных средах, приготовленных на этих НАВ, приведены в табл. 3.2 -3.5 и на рис. 3.1-3.3.

Таблица 3.2. Спектр клеточных популяций в культурах клеток крови человека, приготовленных на неконтактно активированных водах на основе осмотической воды

Вода, условия активации	% 1- ядерных клеток ³	% 2- ядерных клеток ⁴	% 3- ядерных клеток ⁵	% 4- ядерных клеток ⁶	% полиядерных клеток ⁷
Контроль	21,47	31,97	7,05	29,49	1,89
Католит 20 мА час	42,09***	39,36**	6,28	7,46***	0,20***
Католит 20 мА сутки	32,19***	41,06***	8,49	13,23***	0,49**
Католит 40 мА час	53,54***	37,50*	1,26***	3,89***	0,39**
Католит 40 мА сутки	66,04***	29,72	0,48***	1,44***	0,19***
Католит 60 мА час	61,55***	33,12	0,69***	2,57***	0,29**
Католит 60 мА сутки	60,20***	32,22	1,80***	1,90***	0,0***
Анолит 60 мА час	67,98***	24,44**	0,10***	0,10***	0,0***
Анолит 60 мА сутки	67,67***	12,23***	0,0***	0,0***	0,0***

Примечание:

*) – значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$;

**) – значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,01$;

***) – значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,001$

В табл. 3.2 видно, что все изученные воды тормозили пролиферацию клеток в культуре относительно контроля, что особенно заметно по увеличению численности фракции одноядерных клеток и уменьшению доли ускоренно делящихся (рис. 3.1.). Интересно, что с увеличением силы тока, при котором были получены **контактно** активированные воды, использованные затем для неконтактной активации, частоты одноядерных клеток во всех культурах дозозависимо возрастали одновременно со снижением численности фракции ускоренно делящихся клеток.

На рис. 3.1 легко заметить, что спектры делящихся клеток в культурах, приготовленных на анолитах и католитах, различалось качественно: только в культурах на анолитах торможение пролиферации было столь велико, что фракции

³Здесь и далее:

Клетки, которые не делились после введения в культуру цитохалазина В.

⁴ Клетки, которые с момента введения в культуру цитохалазина В прошли 1 клеточный цикл.

⁵ Клетки, которые с момента введения в культуру цитохалазина В прошли 2 клеточных цикла, что сопровождалось асимметричным распределением генетического материала.

⁶ Клетки, которые с момента введения в культуру цитохалазина В прошли 2 клеточных цикла.

⁷Клетки, которые с момента введения в культуру цитохалазина В прошли более 2 клеточных цикла.

ускоренно делящихся клеток в спектре клеточных популяций отсутствовали. Кроме того, в культурах на катодах численность фракции 2-ядерных клеток в зависимости от условий активации изменялась мало, а в культурах на анодах она была значительно меньше, чем в контроле.

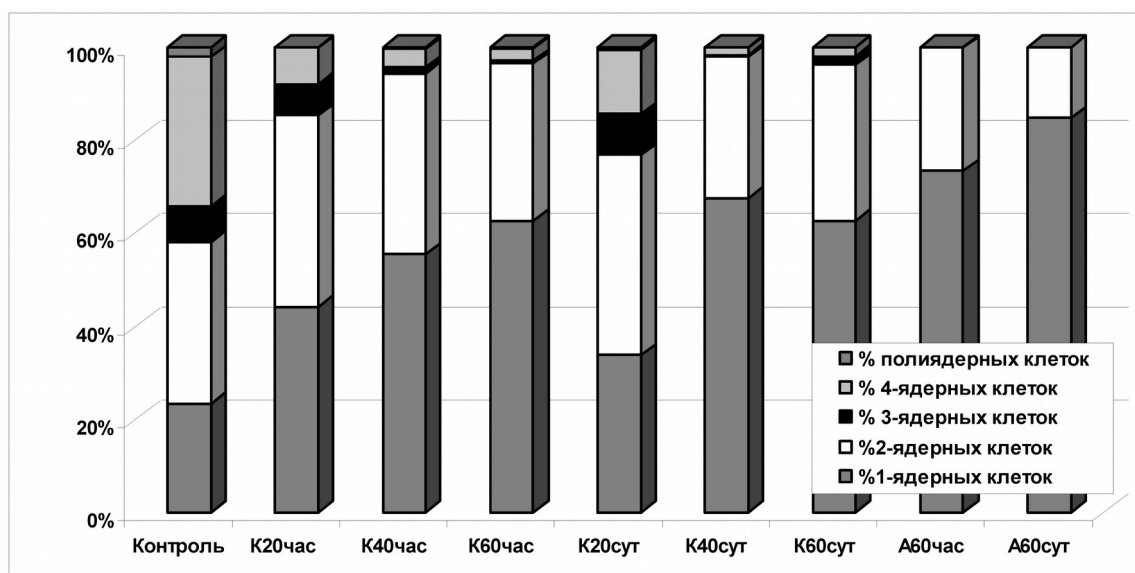


Рисунок 3.1. Спектр клеточных популяций в реконструированных средах, приготовленных на активированных водах на основе осмотической воды.

Обозначения:

Контроль – осмотическая артезианская вода без обработки, ОВП=325,9мВ;
 K20час – католит, получен при силе тока = 20 мА, время активации 60 мин, ОВП=9,6мВ;
 K40час – католит, получен при силе тока = 40 мА, время активации 60 мин, ОВП=-39,9мВ;
 K60час – католит, получен при силе тока = 60 мА, время активации 60 мин, ОВП=-61,7мВ;
 K20сут – католит, получен при силе тока = 20 мА, время активации 24 час, ОВП=149,2мВ;
 K40сут – католит, получен при силе тока = 40 мА, время активации 24 час, ОВП=113,7мВ;
 K60сут – католит, получен при силе тока = 60 мА, время активации 24 час, ОВП=206,0мВ;
 A60час – анолит, получен при силе тока = 60 мА, время активации 60 мин, ОВП=346,4мВ;
 A60сут – анолит, получен при силе тока = 60 мА, время активации 60 час, ОВП=360,8мВ.

Следует отметить, что в целом полученные данные свидетельствуют о наличии не одной, а двух похожих дозовых зависимостей, соответствующих различной продолжительности неконтактной активации осмотической воды, причем на рис. 3.1 видно, что активация воды в течение суток не индуцирует более выраженное торможение пролиферации, чем часовая активация.

В литературе торможение пролиферации обычно связывают с репарацией индуцированных генетических повреждений [141, 147, 159, 162].

Таблица 3.3. Интегральные показатели пролиферативной активности в культурах клеток крови человека, приготовленных на неконтактно активированных водах на основе осмотической воды

Вода, условия активации	Митотическая активность, %	% делящихся клеток в популяции	% ускоренно делящихся клеток	Индекс репликации, ед.	Индекс пролиферации, ед.	Асимметрия деления во 2-м митозе, ед.
Контроль	5,46	70,4	38,43	2,24	2,01	0,24
Католит 20мА час	3,83	53,29***	13,94***	1,69	1,63	0,83***
Католит 20мА сутки	4,15	63,27**	22,21***	1,93	1,81	0,64***
Католит 40мА час	3,41*	43,05***	5,55***	1,48	1,45	0,33
Католит 40мА сутки	2,13***	31,83***	2,11***	1,33	1,32	0,31
Католит 60мА час	1,78***	36,67***	3,56***	1,4	1,38	0,26
Католит 60мА сутки	3,59*	35,91***	3,69***	1,38	1,36	0,99**
Анолит 60мА час	1,48***	24,64***	0,20***	1,18	1,17	0,00
Анолит 60мА сутки	1,43***	12,23***	0,00***	0,92	0,92	0,00

Примечание:

*) – значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$

**) – значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,01$

***) – значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,001$

Значения интегральных показателей пролиферации (табл. 3.3) также снижались по сравнению с контролем практически во всех экспериментальных культурах ($X^2 = 2,22 - 122,00$). Самая низкая активность репликации и пролиферации наблюдалась в культурах, приготовленных на неконтактно-активированных анолитах (табл. 3.3). Индексы репликации ядер и пролиферации клеток также закономерно снижались с увеличением силы тока при получении контактно активированных вод. Интересна и пока не находит объяснения параллельность линейных трендов для католитов, полученных при разной продолжительности экспозиции, а также отличие этих трендов от данных для анолитов (рис. 3.2).

Важно, что во всех культурах на основе неконтактно-активированных католитов, полученных при силе тока контактной активации 20мА и 60мА при экспозиции в течение суток, наблюдалось существенное повышение частоты клеток, образовавшихся в результате асимметричного деления клеток во втором митозе ($X^2 = 7,71 - 17,68$, табл. 3.3), что свидетельствует о значительном увеличении степени нестабильности генома клеток крови, культивированных в

контакте с этими водами. Во всех остальных сериях эксперимента наблюдалась та же закономерность, но очень низкие частоты клеток второго митоза, обнаруженные в них (табл. 3.2), не позволили выявить значимость различий с контролем.

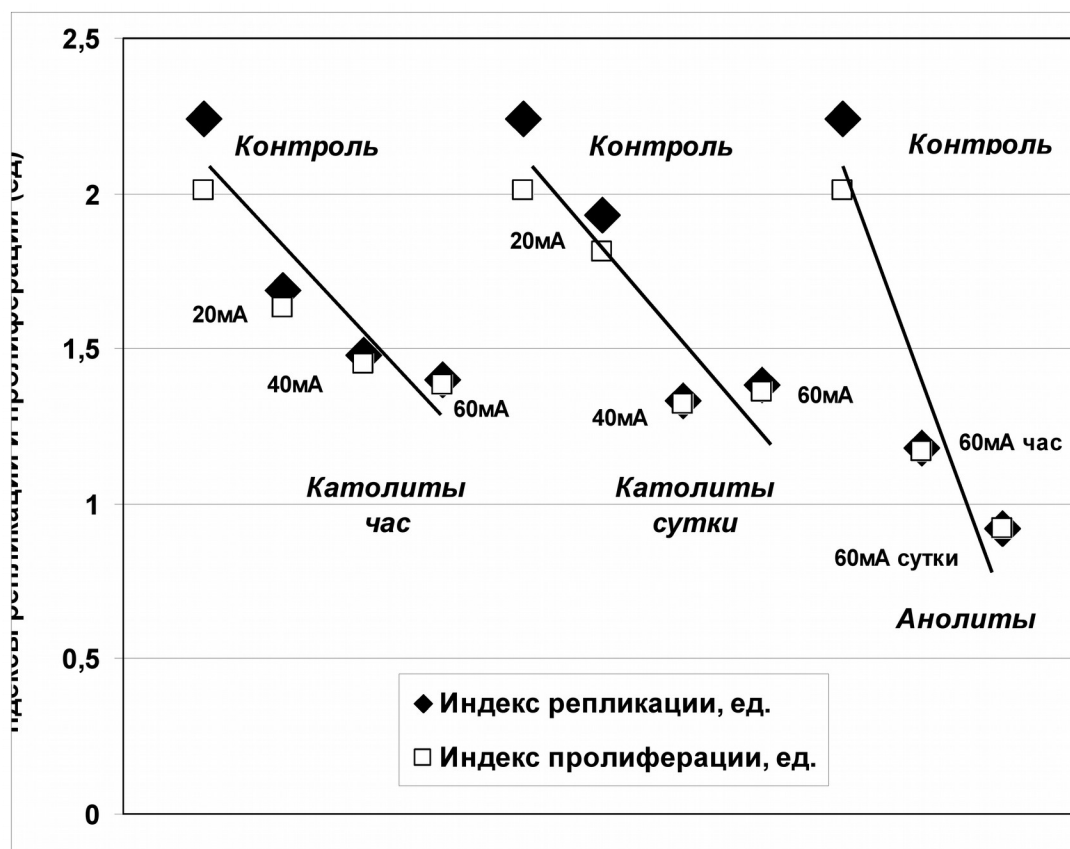


Рисунок 3.2. Закономерности изменения индексов репликации ядер и пролиферации клеток крови человека в реконструированных средах, приготовленных на неконтактно активированных водах на основе осмотической воды (линейные тренды).

Известно, что самые высокие частоты клеток с повреждениями, как правило, наблюдаются во фракциях ускоренно делящихся клеток [41], но так как при анализируемых воздействиях частоты таких клеток исчезающе малы, единственной фракцией делящихся клеток, в которой возможно выявление генетических повреждений, являются двуядерные клетки.

Таблица 3.4. Частоты клеток с повреждениями в культурах крови человека, приготовленных на неконтактно активированных водах на основе осмотической ВОДЫ

Вода, условия активации	% 2-ядерных клеток с МЯ	% 2-ядерных клеток с НПМ	% 3-ядерных клеток с МЯ	% 3-ядерных клеток с НПМ	% 4-ядерных клеток с МЯ	% 4-ядерных клеток с НПМ	% полиядерных клеток с МЯ	% полиядерных клеток с НПМ
Контроль	1,09	0,14	9,86	8,45	17,85	10,10	10,53	10,53
Католит 20мА час	2,30*	0,70*	9,38	9,38	25,0	6,58	0,0	0,0
Католит 20мА сутки	1,1	0,35	23,26*	9,30	22,39	6,72	0,0	20,0
Католит 40мА час	0,45*	0,1	0,0	0,0	22,50	0,00	0,0	0,0
Католит 40мА сутки	1,58	0,59	0,0	0,0	6,67	6,67	50,00	0,0
Католит 60мА час	1,09	0,3	0,0	0,0	15,38	0,0	33,33	66,67
Католит 60мА сутки	0,9	0,35	16,67	0,0	15,79	5,26	0,0	0,0
Анолит 60мА час	4,55***	1,65***	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Анолит 60мА сутки	10,57***	8,61***	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Примечание:

*) – значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$;

**) – значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,01$;

***) – значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,001$

Действительно, в данной постановке, значимое повышение частоты клеток с микроядрами и нуклеоплазменными мостами над уровнем контроля наблюдалось преимущественно в двуядерных клетках во всех культурах, выращенных на анолитах (табл. 3.4), а также в культурах на католитах, полученных при минимальной экспозиции ($X^2 = 2,65 - 16,39$).

Дальнейший анализ полученных данных (табл. 3.5) выявил разнонаправленность сдвигов уровня апоптоза, который в культурах на католитах уменьшался с увеличением экспозиции, и частотами делящихся клеток с повреждениями. В то же время, в культурах на анолитах частоты делящихся клеток с повреждениями были согласованы с частотой апоптоза, причем оба параметра значительно превышали уровень контроля. На основании этих данных можно предположить, что в средах на католитах апоптоз блокируется и клетки с повреждениями выживают и продолжают движение по циклу.

Таблица 3.5. Интегральные показатели генетических повреждений в культурах клеток крови человека, приготовленных на неконтактно активированных водах на основе осмотической воды

Вода, условия активации	% двуядерных клеток с повреждениями	% делящихся клеток с повреждениями	% ускоренно делящихся клеток с повреждениями	Частота апоптоза, %
Контроль	1,09	4,61	25,84	2,68
Католит 20мА час	2,30**	3,78	25,35	0,79**
Католит 20мА сутки	1,10	4,00	30,22	0,39***
Католит 40мА час	0,45*	0,87***	15,79	0,0***
Католит 40мА сутки	1,58	1,88***	13,64	0,0***
Католит 60мА час	1,09	1,37***	19,44	0,0***
Католит 60мА сутки	0,90	1,23***	18,92	0,30***
Анолит 60мА час	4,55***	4,52	0,0	5,93***
Анолит 60мА сутки	10,57***	10,57***	0,0	6,44***

Примечание:

*) – значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$

**) – значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,01$

***) – значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,001$

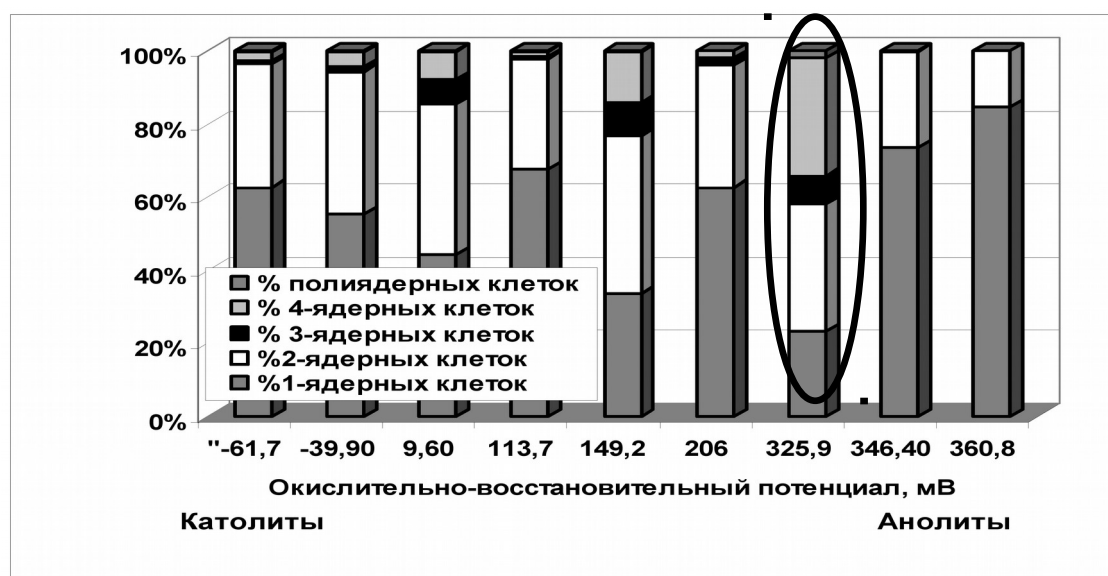


Рисунок 3.3. Анализ связи спектра клеточных популяций с окислительно-восстановительным потенциалом вод, на которых были приготовлены реконструированные среды для культивирования клеток крови.

Овалом выделен спектр клеточных популяций в контроле.

Принципиальные различия между католитами и анолитами выявились также и при анализе связей пролиферативной активности клеток крови человека с частотами клеток, несущих генетические повреждения (рис. 3.4).

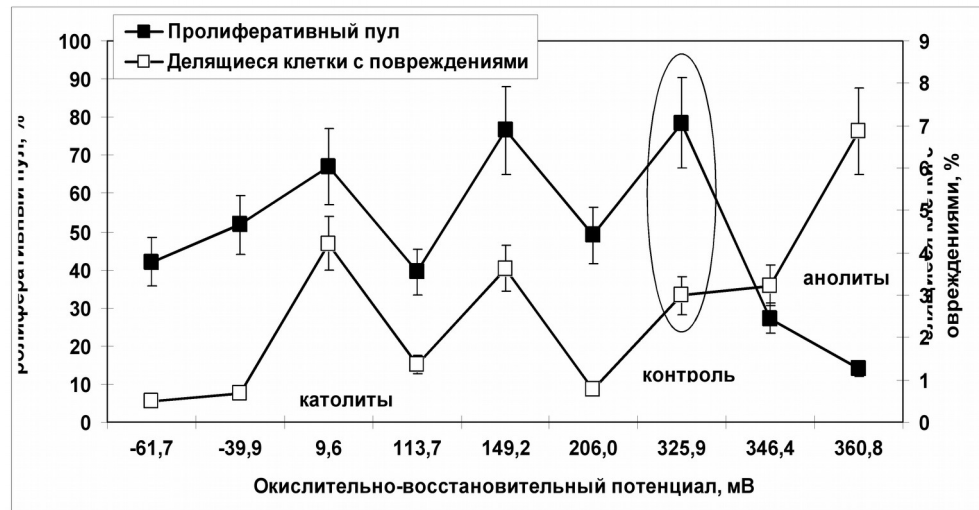


Рисунок 3.4. Связь пролиферативной активности клеток крови человека с частотами клеток, несущих генетические повреждения, в реконструированных средах, приготовленных на различных НАВ

Корреляционный анализ, проведенный для всего массива данных связи между этими показателями не выявил ($r = -0,08$; $p=0,78$). Однако такая связь была обнаружена при рассмотрении только эффектов католитов ($r = 0,63$; $p=0,035$). Поскольку в эксперименте были использованы всего 2 пробы на анолитах, значимости корреляционных связей в них выявлено быть не могло. На рис. 3.4 видно, что для католитов связь между показателями пролиферации и частотой клеток с повреждениями была прямой: частота поврежденных клеток снижалась со снижением пролиферативной активности культуры, а для анолитов - наоборот.

3.2. Оценка чувствительности генома к действию стандартного мутагена

Для оценки безопасности фактора важно изучить не только его собственные генотоксические свойства, но и возможное влияние на чувствительность генома клеток к мутагенному воздействию. Для этого в том же эксперименте в параллельные культуры вводили разные концентрации стандартного мутагена МННГ (табл. 3.6-3.10 и рис. 3.5 и 3.6).

Таблица 3.6. Спектр клеточных популяций в культурах клеток крови человека, приготовленных на неконтактно активированных водах на основе осмотической воды и экспонированных
3 мкг/мл стандартного мутагена МННГ

Вода, условия активации	% 1- ядерных клеток	% 2- ядерных клеток	% 3- ядерных клеток	% 4- ядерных клеток	% полиядерных клеток
Контроль	33,23	40,14	5,67	14,21	1,80
Католит 20мА час	40,22**	33,23**	6,61	13,12	1,06
Католит 20мА сутки	34,964	40,81	7,15	11,12*	0,80
Католит 40мА час	53,07***	38,02	2,08***	3,47***	0,10
Католит 40мА сутки	44,81***	37,32	4,33	8,31***	0,58
Католит 60мА час	56,04***	34,43*	2,35***	3,43*	0,19
Католит 60мА сутки	70,3***	26,3***	0,4***	0,7***	0,0
Анолит 60мА час	86,4***	4,6***	0,0***	0,0***	0,0
Анолит 60мА сутки	87,4***	3,72***	0,17***	0,0***	0,0

Примечание:

*) – значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$

**) – значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,01$

***) – значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,001$

Из данных, приведенных в табл. 3.6, следует, что действие 3 мкг/мл МННГ по сравнению с собственным контролем практически при всех условиях активации воды вызывало только торможение пролиферации клеток, о чем, прежде всего, свидетельствует увеличение доли неделящихся одноядерных клеток в спектре клеточных популяций. В двух случаях из 8 – и только для анолитов - частоты одноядерных клеток в культурах с МННГ были значимо выше, чем в культурах без мутагена ($X^2=23,51$ и $3,41$ для активации в течение 120 минут и 24 часов, соответственно).

Сравнение с данными табл. 3.2. показало, что все католиты, активированные при 20 мА, также как католиты, активированные при 40 мА и 60 мА в течение часа вызывали такое же торможение пролиферации клеток, как и под действием мутагена. То есть, в средах на основе этих вод все эффекты торможения пролиферации клеток были обусловлены именно НАВ. В то же время, при активации католитов при 40 мА и 60 мА в течение суток, также как для анолитов торможение пролиферации в присутствии МННГ было большим, чем без мутагена. Этот феномен свидетельствует о том, что чувствительность

генетических структур клеток к действию мутагена зависела от условий приготовления НАВ.

Важно, что экспозиция большой дозой МННГ (6 мкг/мл) не вызвала качественные изменения спектра клеточных популяций ни по сравнению с меньшей дозой мутагена, ни по сравнению с эффектами в культурах, необработанных мутагеном – изменения были только количественными (по сравнению с данными на рис. 3.1.).

В то же время, при экспозиции разными дозами МННГ были выявлены закономерности, свидетельствующие о качественно различном влиянии неконтактно полученных католитов и анолитов на чувствительность клеток к мутагену, причем эти различия были близки к тем, которые были выявлены в культурах без мутагена. Краткое обобщение этих закономерностей приведено на рис. 3.6. Например, в католитах и особенно в анолитах закономерно с увеличением интенсивности и продолжительности активации уменьшался пролиферативный пул клеток в культуре (рис. 3.6.А). При этом частота двуядерных клеток с генетическими повреждениями (рис. 3.6.Б) была выше уровня фона во всех культурах, экспонированных малой концентрацией МННГ, а также в культурах на католитах, полученных с использованием контактно активированных вод при силе тока 20 и 40 мА в течение 120 мин. Во всех остальных вариантах активации воды экспозиция большой концентрацией МННГ приводила к торможению пролиферации и, следовательно, снижению частоты поврежденных клеток. Очень похожие результаты дал сравнительный анализ степени симметрии деления клеток во втором митозе (рис. 3.6.В). Так, минимальная концентрация МННГ индуцировала значимое превышение уровня фона во всех культурах, а максимальная – меньшие по степени выраженности эффекты и только в культурах на католитах, полученных при 60 мА, т.е. в наиболее жестких условиях. И, наконец, частота апоптоза – показатель, который оценивает гибель клеток в результате образования нерепарируемых повреждений (рис. 3.6.Г), была достоверно выше уровня фона во всех культурах,

экспонированных малой концентрацией МННГ, но не отличалась от фона в культурах на катодах, экспонированных большой концентрацией МННГ.

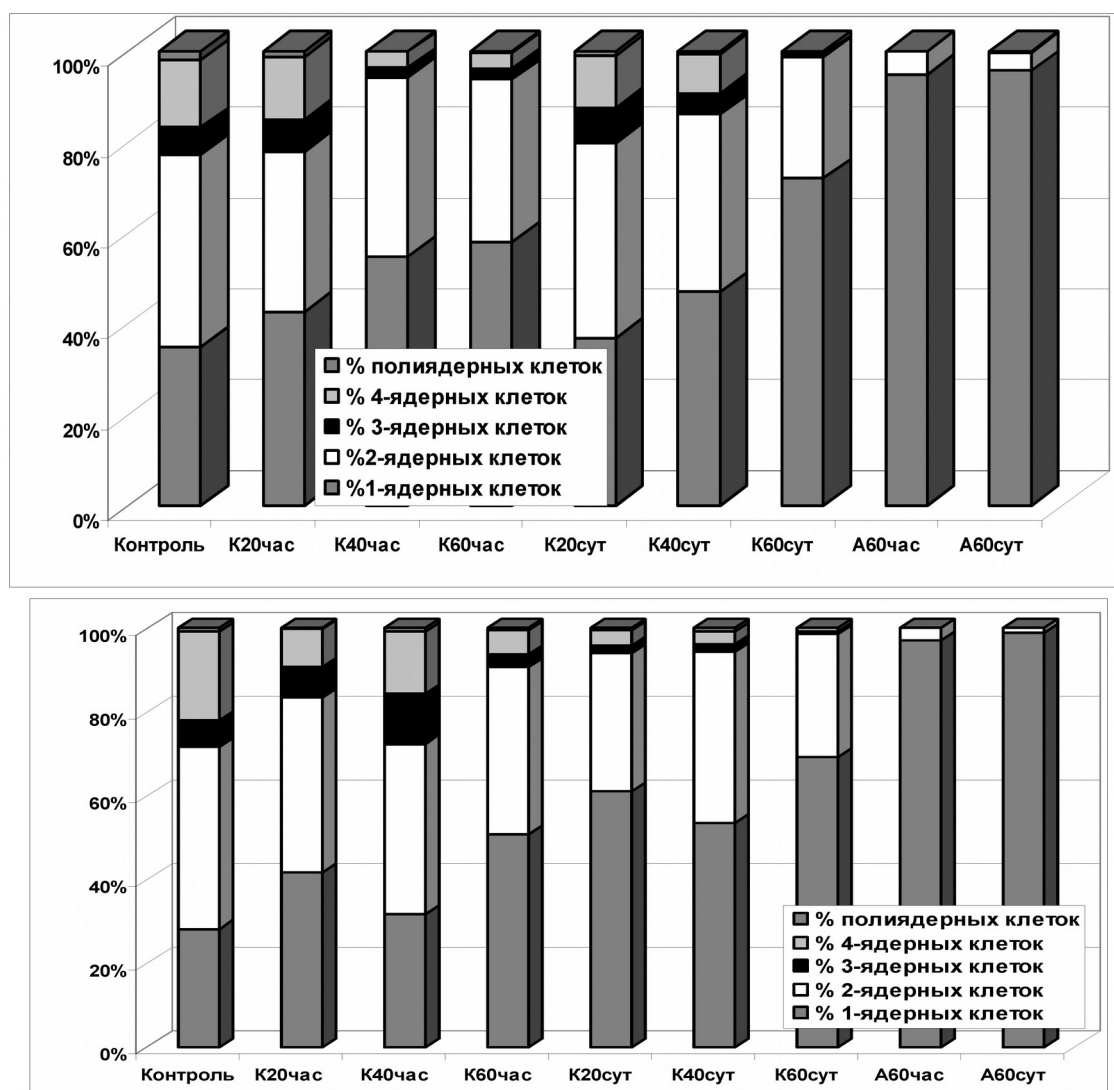


Рисунок 3.5. Спектр клеточных популяций, обнаруженный при инкубации клеток крови человека в реконструированных средах, приготовленных на активированных водах на основе осмотической воды в присутствии 3 мкг/мл МННГ (верхняя гистограмма) и 6 мкг/мл МННГ (нижняя гистограмма). В контрольных культурах использована неактивированная осмотическая вода, экспонированная МННГ в соответствующей концентрации.

Обозначения:

Контроль – осмотическая артезианская вода без обработки, ОВП=325,9 мВ;
 К20час – катодит, получен при силе тока = 20 мА, время активации 60 мин, ОВП=9,6 мВ;
 К40час – катодит, получен при силе тока = 40 мА, время активации 60 мин, ОВП=-39,9 мВ;
 К60час – катодит, получен при силе тока = 60 мА, время активации 60 мин, ОВП=-61,7 мВ;
 К20сут – катодит, получен при силе тока = 20 мА, время активации 24 час, ОВП=149,2 мВ;
 К40сут – катодит, получен при силе тока = 40 мА, время активации 24 час, ОВП=113,7 мВ;
 К60сут – катодит, получен при силе тока = 60 мА, время активации 24 час, ОВП=206,0 мВ;
 А60час – анолит, получен при силе тока = 60 мА, время активации 60 мин, ОВП=346,4 мВ;
 А60сут – анолит, получен при силе тока = 60 мА, время активации 24 час, ОВП=360,8 мВ.

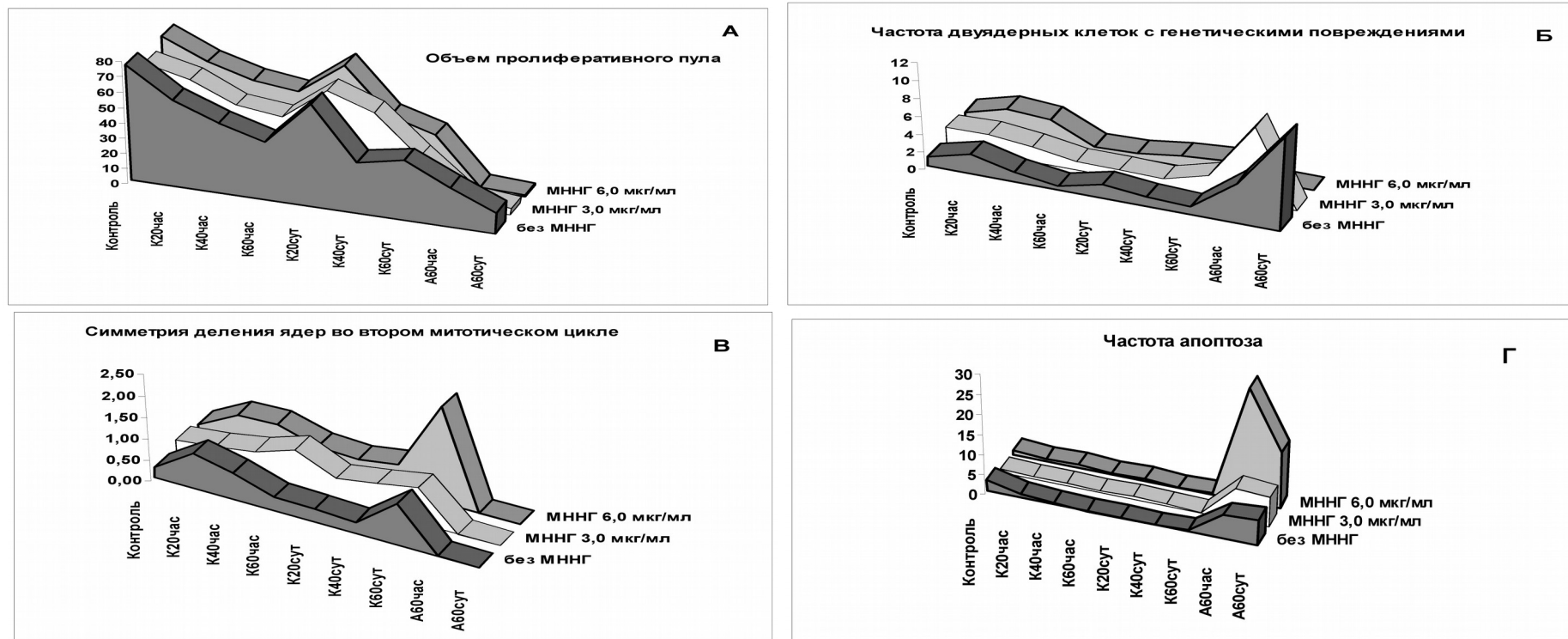


Рисунок 3.6. Изменение объема пролиферативного пула (А), частоты двуядерных клеток с генетическими повреждениями (Б), степени симметрии деления клеток во втором митозе (В) и частота апоптоза (Г) в клетках крови человека, культивированных в реконструированных средах на основе осмотической воды в присутствии 3 мкг/мл и 6 мкг/мл МННГ.

Обозначения:

Контроль – осмотическая артезианская вода без обработки, ОВП=325,9мВ;

К20час – католит, получен при силе тока = 20 мА, время активации 60 мин, ОВП=9,6мВ;

К40час – католит, получен при силе тока = 40 мА, время активации 60 мин, ОВП=-39,9мВ;

К60час – католит, получен при силе тока = 60 мА, время активации 60 мин, ОВП=-61,7мВ;

К20сут – католит, получен при силе тока = 20 мА, время активации 24 час, ОВП=149,2мВ;

К40сут – католит, получен при силе тока = 40 мА, время активации 24 час, ОВП=113,7мВ;

К60сут – католит, получен при силе тока = 60 мА, время активации 24 час, ОВП=206,0мВ;

А60час – анолит, получен при силе тока = 60 мА, время активации 60 мин, ОВП=346,4мВ;

А60сут – анолит, получен при силе тока = 60 мА, время активации 24 час, ОВП=360,8мВ.

Важно отметить, что при анализе всех этих данных, также как и во всех остальных случаях, эффекты анолитов качественно отличались от эффектов католитов. Для сравнения приведем зависимость частоты делящихся клеток с повреждениями от пролиферативного пула в культурах без МННГ (рис. 3.7).

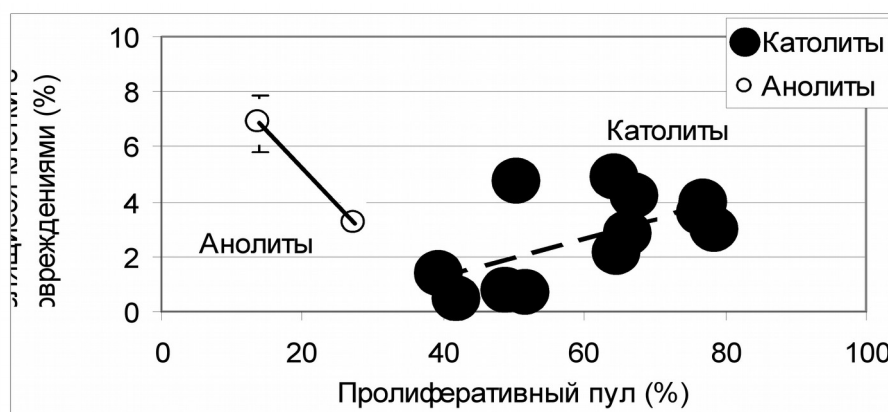


Рисунок 3.7. Зависимость частоты делящихся клеток с повреждениями от пролиферативного пула при культивировании крови человека в реконструированных средах на НАВ: Левый график – для анолитов, правый график - для католитов.

3.3. Заключение по главе

Результаты эксперимента показали, что все изученные условия получения неконтактно активированных вод на основе осмотической воды негативно отражались на показателях нестабильности генома клеток крови человека, культивированных в реконструированных средах на их основе, причем основным эффектом было торможение пролиферации клеток. На этом фоне для католитов, активированных с помощью вод, контактно полученных при силе тока 40 и 60 мА, не удалось обнаружить других проявлений нестабильности генома. Наименьшие отклонения спектра клеточных популяций от контроля были обнаружены в воде, активированной при силе тока 20 мА в течение 24 часов (ОВП 149,2 мВ).

В присутствии малой концентрации стандартного мутагена МННГ во всех культурах лимфоцитов крови человека приготовленных на осмотической воде, неконтактно активированной в различных условиях, наблюдались сходные изменения: торможение, а при использовании большей силы тока для получения контактно активированных вод – стимуляция пролиферации,

повышение степени асимметрии деления генетического материала во втором митотическом цикле и повышение частоты апоптоза. В культурах на анолитах, экспонированных большой концентрацией МННГ, пролиферативная активность и частота двуядерных клеток с повреждениями, как правило, снижались иногда ниже уровня контроля, что могло быть обусловлено не только повышением частоты апоптоза, но значительным торможением пролиферативной активности.

Как без, так и в присутствии МННГ католиты и анолиты, приготовленные из одной и той же воды, различались качественно, причем более выраженные негативные изменения были отмечены в культурах на анолитах.

Использование двух концентраций стандартного мутагена показало, что порогом адаптации в условиях данного эксперимента являлся ответ генома на действие малой концентрации МННГ, поскольку в присутствии максимальной концентрации МННГ были выявлены инвертированные эффекты, связанные с гибелью клеток. Это означает, что само пребывание клеток в стандартных средах, приготовленных на неконтактно активированных водах, является фактором, активизирующим систему клеточной адаптации, то есть, потенциально небезопасным.

Анализ связи эффектов нестабильности генома с окислительно-восстановительным потенциалом активированных вод показал, что минимальные отличия от контроля по всем параметрам наблюдались в диапазоне от 113 до 149 мВ, что позволяет считать этот диапазон самым безопасным из всех исследованных. Однако в экспериментах по дальнейшему изучению генотоксических эффектов неконтактной активации воды имеет смысл использовать более широкий диапазон ОВП.

Полученные данные также свидетельствуют о том, что неконтактная активация воды в течение суток вызывала более выраженное торможение пролиферации клеток, чем часовая активация, что сопровождалось увеличением степени асимметрии распределения генетического материала во втором митозе. В то же время, с увеличением продолжительности активации воды возрастала

вероятность релаксации зарядов и, следовательно, снижения уровней негативных эффектов, что наблюдалось при анализе частоты двуядерных клеток с генетическими повреждениями.

Все изученные условия неконтактной активации осмотической воды увеличивали степень нестабильности генома клеток крови человека, причем основным эффектом было торможение пролиферации клеток, на фоне которого для католитов, полученных с использованием контактных вод, электрохимически активированных при силе тока 40 мА и 60 мА, не удалось обнаружить других проявлений нестабильности генома. Наименьшие отклонения спектра клеточных популяций от контроля были обнаружены в воде, активированной в течение 24 часов в контактно полученных водах при силе тока 20 мА (ОВП 149,2 мВ). Кроме того, мы не обнаружили различий в эффектах вод, активированных в течение 60 мин и 24 часов в одних и тех же водах, контактно полученных при одной и той же силе тока, что позволяет сократить время активации.

В заключение следует отметить, что в этом эксперименте не удалось обнаружить монотонной зависимости цитогенетических показателей от ОВП.

Для дальнейшего изучения эффектов неконтактной активации представляется целесообразным:

1. Использовать широкий диапазон значений ОВП (от – 60 до +360 мВ);
2. Для получения **неконтактно** активированных католитов эффективна короткая (не более 60 мин) экспозиция в водах, полученных контактным способом при силе тока 60 мА.
3. Изучить генотоксические эффекты неконтактно активированной водопроводной воды, поскольку именно эта вода имеет наибольшую вероятность быть использованной в бытовых активаторах.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ НЕКОНТАКТНО АКТИВИРОВАННЫХ ВОД НА ОСНОВЕ ВОДОПРОВОДНОЙ ВОДЫ

В описанных выше экспериментах на культуре крови человека мы изучали генотоксическое действие неkontaktно активированных вод, приготовленных на основе осмотической воды с низкой минерализацией. Поскольку ни в одном руководстве к приборам для получения неkontaktно активированных вод мы не нашли указания, какую именно воду следует активировать, велика вероятность того, что в быту для электрохимической активации будет использована водопроводная вода. Обнаружение эффектов нестабильности генома у активированной осмотической воды предполагает высокую вероятность их наличия и у неkontaktно активированных вод на основе водопроводной воды. Поэтому на следующем этапе работы мы изучали эффекты неkontaktно активированных вод, полученных на основе московской водопроводной воды.

Таблица 4.1. Общая характеристика физико-химических свойств НАВ, приготовленных на основе московской водопроводной воды.

	Условия активации: сила тока (при получении контактно активированных вод) и время активации (при получении неконтактно активированных вод)	Окислительно- восстанови- тельный потенциал ОВП, мВ	Светосумма хемилюминесцен- ции *10 ⁴ , усл.ед.	Доля структурированной (связанной) фазы в воде, q	
				Среднее,%	Вариация, Var
Контроль		226,72	7,33	0,188	0,049
Катодиты	60 мА 5 мин	173,71	8,95	0,202	0,044
	60 мА 20 мин	73,95	7,21	0,201	0,044
	60 мА 40 мин	40,69	6,59	0,181	0,057
Анолит	60 мА 40 мин	259,96	7,29	0,173	0,051

4.1. Химический состав московской водопроводной воды и неконтактно активированных вод, полученных на ее основе

Хотя полиэтиленовые пакеты, использованные в наших экспериментах для получения НАВ, разрешены для хранения и замораживания грудного молока, в данной работе была проведена оценка возможного влияния процесса активации воды на диффузию химических веществ из материала пленки в воду. Московскую водопроводную воду активировали в выбранных для последующей работы режимах. В табл. 4.2 и 4.3 приведены

Таблица 4.2. Содержание неорганических ионов в НАВ, приготовленных на московской водопроводной воде

	Исходная вода	Католит 5 мин	Католит 20 мин	Католит 40 мин	Анолит 40 мин	ПДК в питьевой воде
пероксид, мкг/л	16,4	19,9	18,9	15,7	14,1	100,0
раств.кислород, мг/л	10,17	9,86	9,88	9,7	11,16	н/д
активный хлор, мг/л	0,04	н/о	н/о	н/о	0,0961	0,5
Катионы, мг/л						
Li ⁺	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,03
Na ⁺	14,1	14,1	14,1	14,1	14,1	200,0
NH ₄ ⁺	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	2,0
K ⁺	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	н/д
Mg ²⁺	14	14	14	14	14	50,0
Ca ²⁺	64	64	64	64	64	н/д
Sr ²⁺	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	7,0
Ba ²⁺	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	0,1
Zn ²⁺	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	5,0
Mn ²⁺	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Анионы, мг/л						
F ⁻	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	1,5
Cl ⁻	24	24	24	24	24	350,0
NO ₂ ⁻	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	3,0
Br ⁻	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,2
NO ₃ ⁻	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	45,0
PO ₄ ³⁻	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	3,5
SO ₄ ²⁻	42	42	42	42	42	500,0
BrO ₃ ⁻	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	н/д
ClO ₂ ⁻	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,2
ClO ₃ ⁻	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	20,0

Таблица 4.3. Содержание органических соединений в НАВ, приготовленных на московской водопроводной воде

Углеводороды	Формула	Исходная вода	католит 5 мин	католит- 20 мин	католит- 40 мин	анолит 40 мин	ПДК в питьевой воде
		Концентрация, мг/л					
Додекан	C ₁₂ H ₂₆	0,003	н/о	н/о	0,003	0,002	н/д
Тетрадекан	C ₁₄ H ₃₀	0,003			0,003	0,002	н/д
1-Гексадеканол	C ₁₆ H ₃₄ O	н/о -	н/о	н/о	н/о -	0,003	н/д
2,4-Ди-трет-бутил-фенол	C ₁₄ H ₂₂ O	0,008	0,08	0,028	0,004	0,045	н/д
Додекановая	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	0,003	н/о	н/о	н/о -	н/о -	н/д
Тетрадекановая	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	0,004	н/о	н/о	0,008	0,005	н/д
Диоксапентадекан	C ₁₃ H ₂₈ O ₂	0,005	н/о	н/о	0,005	н/о -	н/д
2-Метил-1(1,1-диметилэтил)-2-метил) 1,3-пропандиловый эфир пропионовой кислоты	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	0,051	н/о	н/о	0,053	0,004	н/д
Метилловый эфир 3-оксо-2-пентил циклопентан уксусной кислоты	C ₁₃ H ₂₂ O ₃	0,007	н/о	н/о	0,005	н/о -	н/д
Бутилцитрат	C ₁₈ H ₃₂ O ₇	0,011	н/о	н/о	0,013	0,01	н/д
Диметилфталат	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	0,004	0,005	0,001	0,005	н/о -	0,3
Диэтилфталат	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	0,003	н/о	н/о	0,002	н/о -	н/д
Диизобутилфталат	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	0,02	0,008	0,002	0,011	0,006	н/д
Дибутилфталат	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	0,043	0,006	0,005	0,003	0,006	н/д
Неидентифицированные фталаты (3)	до C ₁₂	0,018	0,012	0,015	0,077	0,101	н/д
7,9-Ди-трет-бутил-1-оксаспиро (4,5) дека 6,9-диен-2,8-дион	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	0,005	0,003	0,002	0,003	0,017	н/д

В табл.4.2 и 4.3 видно, что по абсолютному большинству показателей все образцы неконтактно активированной воды не отличались от исходной, в которой содержание всех выявленных соединений не превышало ПДК для питьевых вод. Исключение составили неидентифицированные фталаты, содержание которых в католите, активированном при максимальной экспозиции, и в анолите, было значительно выше контроля.

4.2. Оценка нестабильности генома на культуре клеток крови человека

4.2.1. Спонтанные эффекты

Результаты цитогенетического анализа показаны в табл. 4.4-4.7.

Анализ спектра клеточных популяций (табл. 4.4 и рис. 4.1) четко свидетельствуют о том, что в культурах, выращенных на реконструированных средах на основе вод с разным типом (анолит и католиты) и продолжительностью активации, наблюдалось различное соотношение численности клеточных популяций, связанное с влиянием НАВ на процессы клеточного деления. Так, по сравнению с достаточно гармоничным распределением клеточных фракций в контроле (отличавшемся от культуры, выращенной на фирменной жидкой среде RPMI-1640 только несколько большей частотой клеток, прошедших 2 цикла деления, и, соответственно, меньшей частотой 2-ядерных клеток) в 5-минутном католите практически вдвое увеличилась частота 2-ядерных клеток.

Таблица 4.4. Спектр клеточных популяций в культурах клеток крови человека, приготовленных на неконтактно активированных водах на основе московской водопроводной воды

Вода, условия активации	% 1-ядерных клеток	% 2-ядерных клеток	% 3-ядерных клеток	% 4-ядерных клеток	% полиядерных клеток	Митотическая активность, %
Контроль стандартная среда RPMI 1640	30,85	39,56	10,53	13,97	1,27	3,45
Контроль водопроводная вода без активации	33,40	25,80	3,80	27,60	3,20	3,80
Католит 5 мин	21,39***	54,46***	5,94***	11,68***	0,79***	3,96
Католит 20 мин	32,03	38,14***	4,75*	16,95***	1,36**	3,39
Католит 40 мин	32,87	35,86***	4,18	20,12***	2,59	3,39
Анолит	45,58	26,15	6,53**	12,31***	1,54*	4,04

Примечание:

*) – значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$

**) – значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,01$

***) – значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,001$

Как видно в табл. 4.4. и особенно наглядно на рис. 4.1., в ряду католитов с увеличением продолжительности активации для 5-минутного католита

наблюдается активация первого митоза по сравнению с контролем, что реализуется в увеличении фракции 2-ядерных клеток. В то же время, реконструированные среды на катодах, полученных при 20- и 40-минутной экспозиции, практически не различались между собой по спектру клеточных популяций, но в обоих случаях частота двуядерных клеток также была выше уровня контроля ($X^2 = 18,78$ и $11,88$, соответственно). Однако и в этих культурах наблюдалось меньшее количество 4-ядерных клеток, чем в контроле ($X^2 = 17,99$ и $7,71$, соответственно). То есть, в культурах на всех катодах стимулирован первый митоз (2-ядерных клеток больше, чем в контроле), а второй митоз подавлен.

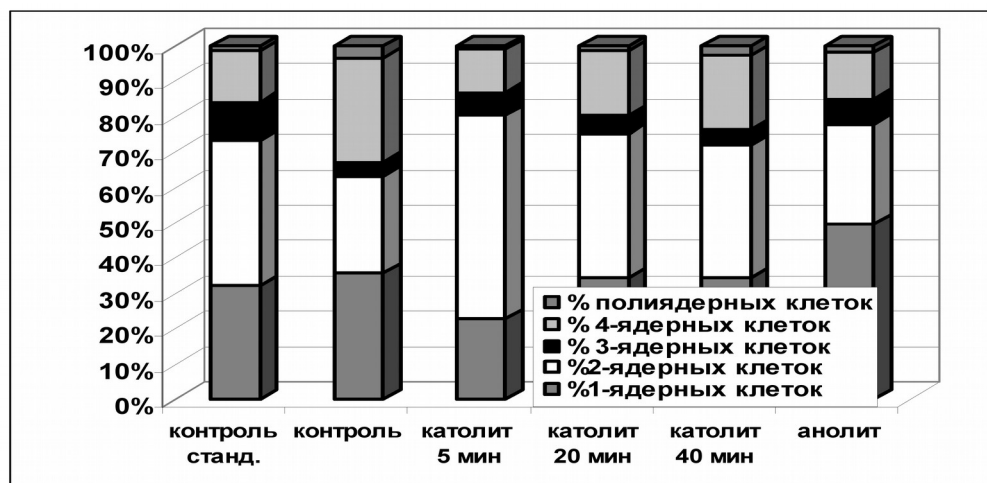


Рисунок 4.1. Спектр клеточных популяций, обнаруженный при инкубации клеток крови человека в реконструированных средах, приготовленных на неконтактно активированных водах на основе московской водопроводной воды

Обозначения:

Контроль станд. – стандартная среда RPMI 1640;

Контроль – московская водопроводная вода без обработки, ОВП=226,7мВ;

Катодит 5 мин - получен при силе тока = 60 мА, время активации 5 мин, ОВП=173,7мВ;

Катодит 20 мин - получен при силе тока =60мА, время активации 20 мин, ОВП=74,0мВ;

Катодит 40 мин – получен при силе тока =60мА, время активации 40 мин, ОВП=40,7мВ;

Анолит – получен при силе тока =60мА, время активации 40 мин, ОВП=260,0мВ

Анолит в общую тенденцию для католиков не вписывался – его влияние на пролиферацию клеток в культуре характеризовалось значительным снижением частоты делящихся клеток ($X^2 = 5,00$), что свидетельствует о торможении пролиферативной активности как на уровне первого, так и второго митоза.

Важно, что этот эффект качественно очень близок к действию анолитов, приготовленных на осмотической воде.

Таблица 4.5. Интегральные показатели пролиферативной активности в культурах клеток крови человека, приготовленных на неконтактно активированных водах на основе московской водопроводной воды

Вода, условия активации	% делящихся клеток в популяции	% ускоренно делящихся клеток	Индекс репликации, ед.	Индекс пролиферации, ед.	Асимметрия деления во 2-м митозе, ед.
Контроль стандартная среда RPMI 1640	65,34	25,77	1,97	1,87	0,75
Контроль водопроводная вода без активации	60,4	34,6	2,07	1,89	0,14
Католит 5 мин	72,87***	18,42*	1,95	1,86	0,51***
Католит 20 мин	61,19	23,05	1,90	1,77	0,28***
Католит 40 мин	62,75	26,89	1,98	1,85	0,21
Анолит	46,54*	20,38	1,66	1,59	0,53***

Примечание:

*) – значимо по сравнению с контролем на водопроводной воде, $p \leq 0,05$

**) – значимо по сравнению с контролем на водопроводной воде, $p \leq 0,01$

***) – значимо по сравнению с контролем на водопроводной воде, $p \leq 0,001$

Как следует из данных табл. 4.4, неконтактная активация воды ни в одном случае не отразилась на митотической активности клеток. В то же время, в культуре, приготовленной на 5-мин католите, частота делящихся клеток была выше, чем в контроле (табл. 4.5; $X^2 = 12,91$), что наблюдалось на фоне снижения частоты ускоренно делящихся клеток ($X^2 = 2,03$) и сопровождалось значительным увеличением степени асимметрии второго митоза ($X^2 = 16,62$). В работе Н.Е.Мошкова [69] было доказано, что частота образования асимметричных 3-ядерных клеток значимо и с очень высокими коэффициентами корреляции ассоциирована с асимметрией площадей ядер в двуядерных клетках. На основании этих данных можно предположить, что

увеличение пула делящихся клеток на фоне уменьшения объема фракции ускоренно делящихся клеток в культурах, приготовленных на НАВ, связано с возникновением генетических повреждений уже на уровне первого митоза (в 2-ядерных клетках). В культуре, приготовленной на 20-минутном католите, также наблюдалось двукратное по сравнению с контролем без активации ($X^2 = 4,89$) увеличение степени асимметрии клеток во втором митозе, однако при большей продолжительности активации – в 40 мин католите - повышение частоты 3-ядерных клеток обнаружено не было.

Для анолита было отмечено снижение пролиферативной активности ($X^2 = 5,00$), сопровождавшееся значительным увеличением частоты асимметричного расхождения хромосом во втором митозе ($X^2 = 18,71$).

Важно отметить, что во фракции 2-ядерных клеток было выявлено только снижение частоты клеток с МЯ (для 20- и 40-минутных католитов, $X^2=5,37$ и $7,11$, соответственно), в то время как частоты 2-ядерных клеток с НПМ ни в одном случае не отличались от контроля. Анализ данных по частотам клеток с микроядрами и мостами во всех фракциях клеток обнаружил увеличение частоты клеток с повреждениями только в культурах, приготовленных на 5 минутном католите (по частоте полиядерных клеток с НПМ, $X^2 = 2,81$) и 40-минутном католите (по частоте 3-ядерных клеток с НПМ, $X^2 = 2,93$ и полиядерных клеток с НПМ, $X^2=2,64$). В культуре на анолите было обнаружено повышение частоты 3-ядерных клеток с МЯ ($X^2=2,88$).

Анализ суммарных показателей генетических повреждений (табл. 4.7) обнаружил снижение по сравнению с контролем частот двуядерных клеток с повреждениями (МЯ и НПМ) в культурах, приготовленных на 20- и 40-мин католитах. Повышение частот ускоренно делящихся клеток с повреждениями было отмечено только для культур на 5-мин католите и на анолите.

Таблица 4.6. Частоты клеток с повреждениями в культурах крови человека, приготовленных на неконтактно активированных водах на основе московской водопроводной воды

Вода, условия активации	% 2-ядерных клеток с МЯ	% 2-ядерных клеток с НПМ	% 3-ядерных клеток с МЯ	% 3-ядерных клеток с НПМ	% 4-ядерных клеток с МЯ	% 4-ядерных клеток с НПМ	% полиядерных клеток с МЯ	% полиядерных клеток с НПМ
Контроль стандартная среда RPMI 1640	0,29	0,19	1,38	1,03	0,52	2,20	0,0	0,0
Контроль водопроводная вода без активации	1,19	0,69	5,26	0,0	7,97	17,39	18,75	12,50
Католит 5 мин	0,77	0,38	20,0	3,33	16,95	20,34	50,0	50,0*
Католит 20 мин	0,3*	0,20	7,14	7,14	7,0	8,0*	0,0	0,0
Католит 40 мин	0,2**	0,20	4,76	14,29*	3,96	14,85*	15,38	38,46*
Анолит	1,48	0,30	23,53*	8,82	14,06	18,75	37,50	12,50

Примечание:

*) – значимо по сравнению с контролем на водопр. воде, $p \leq 0,05$

**) – значимо по сравнению с контролем на водопр. воде, $p \leq 0,01$

Таблица 4.7. Суммарные показатели генетических повреждений в культурах клеток крови человека, приготовленных на неконтактно активированных водах на основе московской водопроводной воды

Вода, условия активации	% двуядерных клеток с повреждениями	% делящихся клеток с повреждениями	% ускоренно делящихся клеток с повреждениями	Апоптоз, %
Контроль стандартная среда RPMI 1640	0,50	3,49	24,60	0,36
Контроль водопроводная вода без активации	1,88	5,08	23,69	2,4
Католит 5 мин	1,15	3,95	35,48**	1,78
Католит 20 мин	0,5***	2,11	13,97**	3,39
Католит 40 мин	0,4***	2,99	22,22	0,99*
Анолит	1,78	4,82	33,96*	3,85

Примечание:

*) – значимо по сравнению с контролем водопр.вода, $p \leq 0,05$;

**) – значимо по сравнению с контролем водопр.вода, $p \leq 0,01$;

***) – значимо по сравнению с контролем водопр.вода, $p \leq 0,001$

4.2.2. Оценка чувствительности генома к действию стандартного мутагена

Результаты анализа параллельных культур с введением мутагена на клетках крови того же донора, показаны в табл. 4.8-4.12 и рис. 4.2-4.3.

Таблица 4.8. Спектр клеточных популяций в культурах крови человека, приготовленных на неконтактно активированных водах на основе московской водопроводной воды и экспонированных 3 мкг/мл стандартного мутагена МННГ

Вода, условия активации	% 1-ядерных клеток	% 2-ядерных клеток	% 3-ядерных клеток	% 4-ядерных клеток	% полиядерных клеток
Контроль	14,85	38,61	8,32	26,73	3,56
Католит 5 мин	18,53*	32,07*	5,98	33,07*	2,39
Католит 20 мин	37,72***	33,85	6,38	14,51***	2,32
Католит 40 мин	33,53***	39,29	7,14	14,48***	1,786*
Анолит	18,98*	24,46***	7,83	31,31*	6,26*

Примечание:

*) – значимо по сравнению с контролем, обработанным 3 мкг/мл МННГ, $p \leq 0,05$

**) – значимо по сравнению с контролем, обработанным 3 мкг/мл МННГ $p \leq 0,01$

***) – значимо по сравнению с контролем, обработанным 3 мкг/мл МННГ $p \leq 0,001$

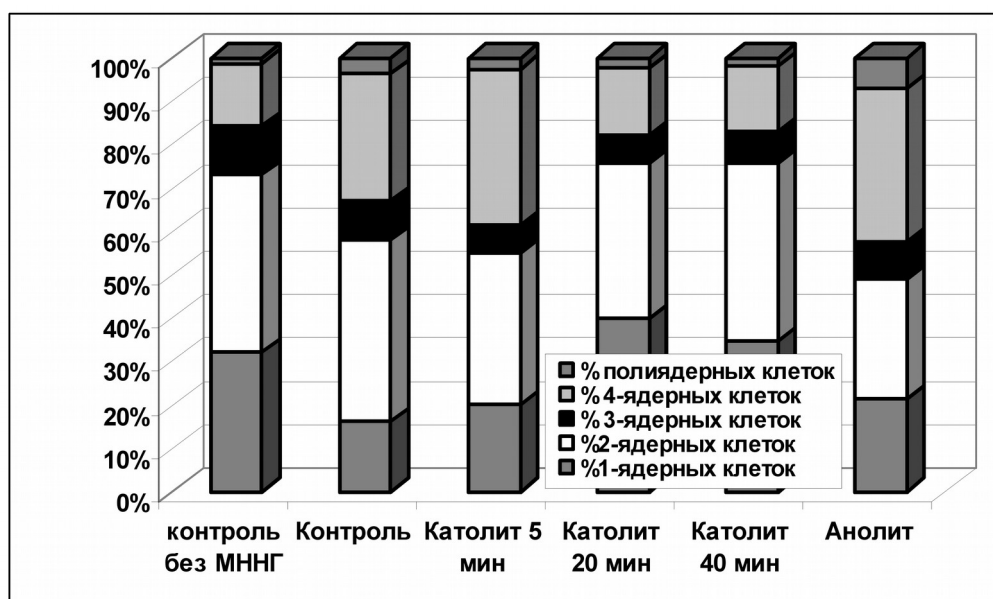


Рисунок 4.2. Спектр клеточных популяций, обнаруженный при инкубации клеток крови человека в реконструированных средах, приготовленных на активированных водах на основе московской водопроводной воды, в присутствии 3 мкг/мл МННГ. Для сравнения в левом столбике показаны данные клеток, культивированных без МННГ.

Как хорошо видно в табл. 4.8 и на рис. 4.2, в присутствии МННГ как в реконструированных средах, приготовленных неактивированной воде, так и на 5-минутном католите наблюдалось ускорение пролиферации клеток, выражавшееся в снижении частоты неделящихся одноядерных клеток ($X^2=$

49,97 и 2,45, соответственно) и увеличении частот двуядерных и ускоренно делящихся клеток ($X^2=4,71$ и 2,51, соответственно). Обращает на себя внимание увеличение частоты 3-ядерных клеток, образовавшихся в результате асимметричного распределения генетического материала по сравнению с клетками, выращенными на неактивированной воде ($X^2=8,99$), что воспроизводит описанные ранее эффекты МННГ [69]. Интересно, что в средах на католитах, полученных при более продолжительной активации, наблюдалось повышение частоты одноядерных клеток ($X^2=68,38$ и 48,01) и снижение объема фракции ускоренно делящихся клеток ($X^2=28,42$ и 26,41, соответственно для 20- и 40-минутных католитов), что свидетельствует о торможении процессов деления клеток.

В культуре, выращенной на анолите, наблюдались качественно иные эффекты: небольшое увеличение пула одноядерных клеток ($X^2=3,08$), значительное уменьшение численности фракции 2-ядерных клеток ($X^2=23,56$) и некоторое ускорение пролиферативной активности, определяемое по увеличению численности фракции 4-ядерных клеток ($X^2=3,95$).

Ускорение пролиферации в контроле и 5-мин. католите по сравнению с клетками, культивированными без МННГ, и существенное снижение пролиферативной активности при более длительной активации католитов полностью подтверждают результаты анализа, сделанные по табл. 4.8 и рис. 4.2.

Интересно, что в МННГ-обработанной культуре на 5-мин. католите численность фракции 3-ядерных клеток была несколько меньше, чем в контроле ($X^2=2,08$), а при более продолжительной обработке эффекты не отличались от контроля. Подобные эффекты возможны при снижении пролиферативной активности, в результате чего клетки просто не доходят до второго митоза.

Таблица 4.9. Интегральные показатели пролиферативной активности в культурах клеток крови человека, приготовленных на неконтактно активированных водах на основе московской водопроводной воды в присутствии 3 мкг/мл МННГ

Вода, условия активации	Митотическая активность, %	% делящихся клеток в популяции	% ускоренно делящихся клеток	Индекс репликации, ед.	Индекс пролиферации, ед.	Асимметрия деления во 2-м митозе, ед.
Контроль без МННГ	3,80	60,4	34,6	2,068	1,888	0,14
Контроль МННГ	5,54	77,23	38,61	2,24	2,08	0,31
Католит 5 мин	4,78	73,51	41,43	2,33	2,07	0,18*
Католит 20 мин	2,71*	57,06**	23,21***	1,83	1,75	0,44*
Католит 40 мин	3,17*	62,70**	23,41***	1,91	1,82	0,49*
Анолит	4,31	69,86**	45,4	2,17	2,04	0,25

Примечание:

Для облегчения сравнения в первой строке таблицы показаны данные, полученные в неактивированной воде в отсутствии МННГ

*) – значимо по сравнению с контролем, обработанным 3 мкг/мл МННГ, $p \leq 0,05$

**) – значимо по сравнению с контролем, обработанным 3 мкг/мл МННГ $p \leq 0,01$

***) – значимо по сравнению с контролем, обработанным 3 мкг/мл МННГ $p \leq 0,001$

Важно, что в присутствии МННГ снижались митотическая активность и степень асимметрии деления клеток во 2 митозе, а также уменьшалась доля ускоренно делящихся клеток в спектре клеточных популяций. Для понимания этих эффектов следует принять во внимание соображения Д.М.Спитковского относительно того, что адаптивный ответ клеток проявляется до тех пор, пока не исчерпан их адаптационный потенциал [99]. Поэтому можно предположить, что в тех случаях, когда культивирование в реконструированных средах требует напряжения систем адаптации клеток, последующее воздействие – в данном случае МННГ - может не проявляться в виде привычного повышения частоты асимметрично делящихся клеток, а только замедлять пролиферацию и/или приводить клетки к гибели до их вступления во второй митотический цикл.

Это предположение подтверждается результатами анализа частот клеток с повреждениями, принадлежащих к разным клеточным фракциям (табл. 4.10). Эффекты МННГ немногочисленны. Прежде всего, это - значительное повышение частот ускоренно делящихся клеток с повреждениями в контроле по сравнению с культурами, выращенными в средах на неактивированной воде, но без МННГ ($X^2=9,86$). Под действием МННГ на культуры, выращенные на НАВ,

наблюдалось только повышение частоты 2-ядерных клеток с нуклеоплазменными мостами (среда на 5-мин. католите, $X^2=4,53$), а также снижение частоты таких клеток в среде на 20- мин. католите во фракции 3-ядерных клеток ($X^2=2,79$) и под действием 40-мин католита во фракция 4-х ($X^2=2,34$) и полиядерных клеток ($X^2=3,00$).

Таблица 4.10. Частоты клеток с повреждениями в культурах крови человека, приготовленных на неконтактно активированных водах на основе московской водопроводной воды в присутствии 3 мкг/мл МННГ

Вода, условия активации	% 2-ядерных клеток с МЯ	% 2-ядерных клеток с НПМ	% 3-ядерных клеток с МЯ	% 3-ядерных клеток с НПМ	% 4-ядерных клеток с МЯ	% 4-ядерных клеток с НПМ	% полиядерных клеток с МЯ	% полиядерных клеток с НПМ
Контроль без МННГ	1,19	0,69	5,26	0	7,97	17,39	18,75	12,5
Контроль МННГ	1,19	0,19	14,29	23,81	10,37	25,19	22,22	44,44
Католит 5 мин	1,19	0,89**	10,0	23,33	7,83	18,67	8,33	25,00
Католит 20 мин	1,00	0,3	6,06	9,09*	9,33	20,0	8,33	25,00
Католит 40 мин	0,79	0,29	5,55	8,33*	8,22	10,95**	0*	11,11*
Анолит	0,85	0,09	7,5	10,0	5,63	19,38	6,25	37,50

Примечание:

Для облегчения сравнения в первой строке таблицы показаны данные, полученные в отсутствии МННГ

*) – значимо по сравнению с контролем, обработанным 3 мкг/мл МННГ, $p \leq 0,05$

**) – значимо по сравнению с контролем, обработанным 3 мкг/мл МННГ $p \leq 0,01$

Трактовать это снижение частот клеток с повреждениями представляется релевантным с учетом численности соответствующих фракций в спектре клеточных популяций (по сравнению с данными табл. 4.8 и рис. 4.2) – чем меньше объем самой фракции, тем меньше в ней клеток с повреждениями. То, что снижение частоты клеток с повреждениями наблюдалось именно во фракциях клеток с НПМ, может быть понято с позиций, высказанных М. Fenech с соавторами [128], о том, что НПМ являются более серьезными повреждениями и долгоживущими повреждениями, чем МЯ, и поэтому такие клетки чаще всего гибнут путем апоптоза или некроза.

Следует отметить, что влияние анолита на индивидуальные частоты клеток с повреждениями не отличалась от контроля ни для одного из изученных показателей (табл. 4.10).

Таблица 4.11. Интегральные показатели генетических повреждений в культурах клеток крови человека, приготовленных на неконтактно активированных водах на основе московской водопроводной воды в присутствии 3 мкг/мл МННГ

Вода, условия активации	% двухъядерных клеток с повреждениями	% делящихся клеток с повреждениями	% ускоренно делящихся клеток с повреждениями	Апоптоз, %
Контроль без МННГ	1,88	5,08	23,69	2,4
Контроль МННГ	1,39	7,48	38,97	2,33
Католит 5 мин	2,10	6,53	27,88**	1,5
Католит 20 мин	1,3	3,93	25,83**	1,08
Католит 40 мин	1,09	2,74	16,95**	5,33**
Анолит	0,94	5,48	26,29**	0,63**

Примечание:

С целью облегчения сравнения в первой строке таблицы показаны данные, полученные в отсутствии МННГ

**) – значимо по сравнению с контролем, обработанным 3 мкг/мл МННГ $p \leq 0,01$

Анализ интегральных показателей повреждения клеток (табл. 4.11) также как и данные табл. 4.10, свидетельствует о том, что введение МННГ в культуру является существенным фактором, изменяющих частоту повреждений, в основном, в клетках второго и последующих митозов. В соответствии со снижением пролиферативной активности во всех культурах, кроме приготовленных на 5-мин. католите, наблюдалось только снижение частоты ускоренно делящихся клеток с генетическими повреждениями. В то же время, в культурах на 40-мин. католите наблюдалось повышение частоты апоптоза, а в культуре на анолите – его существенное снижение. Эти различия могут быть связаны с неравным вкладом процессов апоптоза и некроза в гибель клеток. То есть, активация воды с получением как католитов, так и анолита приводила к повышению чувствительности генома клеток крови человека к дополнительной генотоксической нагрузке стандартным мутагеном МННГ.

Интересно, что в условиях дополнительной генотоксической нагрузки наименьшие отличия от контроля по частотам клеток с повреждениями были обнаружены в реконструированной среде, приготовленной на анолите. Поскольку МННГ в культуру всегда вводили за 20 часов до ее обработки цитохалазином В, можно предположить, что клетки, несущие генетические повреждения, в этих условиях погибали путем некроза еще до создания цитокинетического блока.

Как видно в табл. 4.12, эффекты 5-мин. католита сводились к увеличению пролиферативной активности за счет увеличения количества клеток, прошедших 2 и более митотических цикла ($X^2=4,03$). В то же время, увеличение продолжительности активации католитов характеризовалось торможением пролиферации уже на уровне первого митоза ($X^2 = 8,38$ и $8,73$, соответственно).

Интересно, что действие анолита было ближе всего к контрольной среде без МННГ, но отличалось меньшей частотой 4-ядерных клеток ($X^2=8,34$), что говорит о снижении пролиферативной активности. Анализ интегральных показателей пролиферативной активности (табл. 4.13) подтверждает эти заключения.

Таблица 4.12 Спектр клеточных популяций в культурах клеток крови человека, приготовленных на неконтактно активированных водах на основе московской водопроводной воды и экспонированных 6 мкг/мл стандартного мутагена МННГ

Вода, условия активации	% 1-ядерных клеток	% 2-ядерных клеток	% 3-ядерных клеток	% 4-ядерных клеток	% полиядерных клеток	Митотическая активность, %
Контроль без МННГ	30,85	39,56	10,53	13,97	1,27	3,80
Контроль МННГ	23,32	29,64	9,68	25,69	3,16	5,54
Католит 5 мин	15,8**	29,4	7,8	31,60**	6,20*	5,14
Католит 20 мин	41,88**	34,12*	4,15**	10,47**	2,89	4,6

Вода, условия активации	% 1-ядерных клеток	% 2-ядерных клеток	% 3-ядерных клеток	% 4-ядерных клеток	% полиядерных клеток	Митотическая активность, %
Католит 40 мин	36,99**	36,62**	5,20*	14,68**	0,74**	4,15
Анолит	25,58	32,95	7,95	18,22**	4,26	3,53

Примечание:

*) – значимо по сравнению с контролем, обработанным 6 мкг/мл МННГ, $p \leq 0,05$

**) – значимо по сравнению с контролем, обработанным 6 мкг/мл МННГ $p \leq 0,01$

***) – значимо по сравнению с контролем, обработанным 6 мкг/мл МННГ $p \leq 0,001$

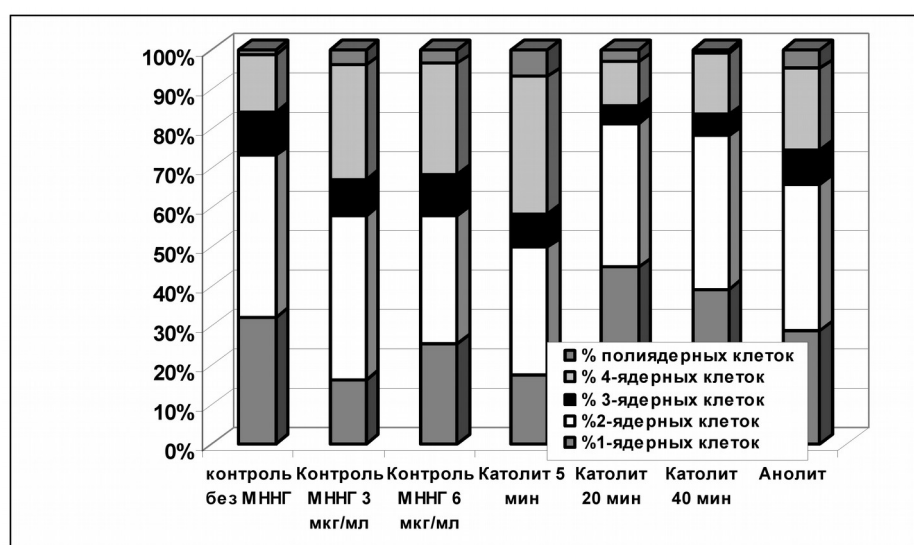


Рисунок 4.3. Спектр клеточных популяций, обнаруженный при инкубации клеток крови человека в реконструированных средах, приготовленных на активированных водах на основе московской водопроводной воды, в присутствии 6 мкг/мл МННГ. Для сравнения в левых столбиках показаны данные для клеток, культивированных без МННГ и в присутствии 3 мкг/мл МННГ.

Более того, сравнение с культурами, выращенными на средах на основе неактивированной воды, но в присутствии 3 мкг/л МННГ (табл. 4.10), показывает, что частоты клеток с повреждениями были ниже либо не превышали эффекты большой дозы МННГ. В то же время, высокая доза МННГ в среде, приготовленной на 5-минутном католите, индуцировала увеличение частоты 3-ядерных клеток с НПМ ($X^2=3,84$).

Однако во всех культурах на католитах в присутствии большой дозы МННГ обнаруживалось снижение частоты 4-ядерных клеток с МЯ ($X^2 = 3,28$; 3,64 и 5,98 для 5-, 20- и 40 мин католитов, соответственно).

Таблица 4.13. Интегральные показатели пролиферативной активности в культурах клеток крови человека, приготовленных на неконтактно активированных водах на основе московской водопроводной воды в присутствии 6 мкг/мл МННГ

Вода, условия активации	% делящихся клеток в популяции	% ускоренно делящихся клеток	Индекс репликации, ед.	Индекс пролиферации, ед.	Асимметрия деления во 2-м митозе, ед.
Контроль без МННГ	60,4	34,6	2,07	1,89	0,14
Контроль 6 мкг/мл МННГ	68,18	38,54	2,14	1,98	0,38
Католит 5 мин	75	45,60*	2,24	2,11	0,25*
Католит 20 мин	51,62	17,51***	1,64	1,67	0,39
Католит 40 мин	57,25	20,63***	1,85	1,72	0,35
Анолит	63,37	30,43**	1,88	1,83	0,44

Примечание:

*) – значимо по сравнению с контролем, обработанным 6 мкг/мл МННГ, $p \leq 0,05$

**) – значимо по сравнению с контролем, обработанным 6 мкг/мл МННГ $p \leq 0,01$

***) – значимо по сравнению с контролем, обработанным 6 мкг/мл МННГ $p \leq 0,001$

Следует отметить, что частоты клеток с нуклеоплазменными мостами в культуре на анолите всегда были выше, чем в соответствующем контроле ($X^2 = 7,41$; 4,48 и 6,97 для 2-, 3- и 4-ядерных клеток, соответственно), чего не наблюдали в культурах на католитах.

Анализ интегральных показателей повреждения клеток (табл. 4.15) свидетельствует о противоположных эффектах для католитов и анолита. И в этом сравнении важную роль играет показатель частоты апоптоза, который согласуется с эффектами, описанными выше, не отличается от контроля для католитов и превышает контроль в среде на анолите ($X^2 = 4,52$).

Таблица 4.14. Частоты клеток с повреждениями в культурах крови человека, приготовленных на неконтактно активированных водах на основе московской водопроводной воды в присутствии 6 мкг/мл МННГ

Вода, условия активации	% 2-ядерных клеток с МЯ	% 2-ядерных клеток с НПМ	% 3-ядерных клеток с МЯ	% 3-ядерных клеток с НПМ	% 4-ядерных клеток с МЯ	% 4-ядерных клеток с НПМ	% полиядерных клеток с МЯ	% полиядерных клеток с НПМ
Контроль без МННГ	1,19	0,69	5,26	0,00	7,97	17,39	18,75	12,5
Контроль МННГ 6 мкг/мл	0,70	0,10	14,29	8,16	12,31	17,69	37,5	12,5
Католит 5 мин	1,09	0,20	7,69	23,08***	5,70**	17,72	25,81	9,68
Католит 20 мин	1,21	0,50*	4,35	17,39	3,45**	17,24	43,75	12,5
Католит 40 мин	0,20*	0,10	0,0**	7,14	2,53**	13,92	0,0*	0,0
Анолит	0,9	1,00**	14,63	24,39***	14,89	32,98***	22,73	27,27

Примечание:

*) – значимо по сравнению с контролем, обработанным 6 мкг/мл МННГ, $p \leq 0,05$

**) – значимо по сравнению с контролем, обработанным 6 мкг/мл МННГ $p \leq 0,01$

***) – значимо по сравнению с контролем, обработанным 6 мкг/мл МННГ $p \leq 0,001$

Таким образом, результаты этого сложного эксперимента показали, что неконтактно активированные водопроводные воды индуцировали следующие эффекты нестабильности генома клеток крови человека:

- изменение пролиферации клеток – в разных вариантах активации наблюдалось как ускорение, так и замедление первого митоза, и во всех вариантах – торможение второго митоза;
- увеличение частоты асимметрично делящихся клеток;
- увеличение частоты ускоренно делящихся клеток с генетическими повреждениями;

Таблица 4.15. Интегральные показатели генетических повреждений в культурах клеток крови человека, приготовленных на неконтактно активированных водах на основе московской водопроводной воды в присутствии 6 мкг/мл МННГ

Вода, условия активации	% двуядерных клеток с повреждениями	% делящихся клеток с повреждениями	% ускоренно делящихся клеток с повреждениями	Апоптоз, %
Контроль без МННГ	1,88	5,08	23,69	2,4
Контроль 6 мкг/мл МННГ	0,80	5,52	29,74	3,36

Вода, условия активации	% двухядерных клеток с повреждениями	% делящихся клеток с повреждениями	% ускоренно делящихся клеток с повреждениями	Апоптоз, %
Католит 5 мин	1,29	5,91	26,32	4,60
Католит 20 мин	1,71*	3,95*	26,80	2,35
Католит 40 мин	0,30*	1,62***	13,51**	2,23
Анолит	1,90*	7,87**	45,86**	6,20*

Примечание:

*) – значимо по сравнению с контролем, обработанным 6 мкг/мл МННГ, $p \leq 0,05$

**) – значимо по сравнению с контролем, обработанным 6 мкг/мл МННГ $p \leq 0,01$

***) – значимо по сравнению с контролем, обработанным 6 мкг/мл МННГ $p \leq 0,001$

- повышение чувствительности генома клеток к мутагенному действию 3 мкг/мл (минимальной из изученных концентраций) стандартного мутагена МННГ и токсическое действие максимальной концентрации;

- при добавлении двух доз стандартного мутагена к среде на основе неактивированной воды наблюдались эффекты, качественно напоминающие вышеперечисленные эффекты активации воды;

- в присутствии двух доз стандартного мутагена МННГ и без него в культурах на водопроводной воде наблюдались эффекты, качественно сходные с действием активированных вод на основе осмотической воды;

При этом:

- соотношение эффектов пролиферацией и частотами клеток с повреждениями для католитов и анолита были разнонаправленными;

- монотонных дозовых зависимостей от времени активации в проявлении эффектов католитов выявлено не было.

Полученные данные позволяют с высокой вероятностью ожидать возникновения генотоксических эффектов *in vivo*. Для проверки этой гипотезы были проведены эксперименты по выпаиванию мышей неконтактно активированными водами, приготовленными на основе московской водопроводной воды.

4.3. Оценка генотоксических эффектов в клетках костного мозга мышей

НАВ, изученные в эксперименте на культуре крови человека также были использованы для запаивания мышей в первые сутки опыта.

Физико-химические свойства НАВ, использованных в эксперименте, представлены в табл. 4.16.

Таблица 4.16. Физико-химические свойства НАВ на основе московской водопроводной воды, использованные для выпаивания мышей

	Условия активации: сила тока (при получении контактно активированных вод) и время активации (при получении неконтактно активированных вод)	Окислительно- восстановитель- ный потенциал, ОВП,мВ	Светосумма хемилюми- несценции *10 ⁴ , усл.ед.	Доля структурированной (связанной) фазы в воде, q	
				Среднее, %	Вариация, Var
Контроль		226,7	7,33	0,188	0,049
Катоды	60мА.....5 мин	173,7	8,95	0,202	0,044
	60мА.....20 мин	73,95	7,21	0,201	0,044
	60мА.....40 мин	40,7	6,59	0,181	0,057
Анолит	60мА.....40 мин	259,96	7,29	0,173	0,051

Выпаивание животных *ad libitum* проводили в рамках подострого эксперимента в течение 30 суток.

Среднегрупповые данные по всем изученным показателям приведены в табл. 4.17.

Таблица 4.17. Среднегрупповые значения частот клеток с разными типами aberrаций хромосом и изменение митотической активности, индуцированных неконтактно активированными водами в клетках костного мозга мышей

Группа/ Продолжительность экспозиции	Пока- затель	Просмотрен о клеток	Клеток с фрагментами, %			Всего клеток с aberrациями, %	Клеток с гепами, %	МИ / 1000 клеток	Значение X^2 (по сравнению с контролем того же срока)		
		n=40±2	один.	парные	множ.				Аберр клетки	Клетки с гепами	МИ
контроль / до начала эксперимента	Ср	600	1,67	0,00	0,50	2,17	0,50	13,67			
	СтОш		0,56	0,00	0,50	1,06	0,22	3,28			
контроль /сутки	Ср	500	1,00	0,20	0,00	1,20	0,60	14,60			
	СтОш		0,63	0,20	0,00	0,83	0,60	2,96			
5-мин католит /сутки	Ср	500	2,40	0,00	0,00	2,40	1,40	12,00	2,93	2,81	0,60
	СтОш		1,08	0,00	0,00	1,08	0,51	2,17			
20 мин католит /сутки	Ср	495	1,60	0,00	0,00	1,60	1,60	12,80	0,31	2,35	0,00
	СтОш		0,75	0,00	0,00	0,75	0,68	2,96			
40 мин католит/ сутки	Ср	500	0,80	0,00	0,20	1,20	0,00	29,20	0,00	3,01	24,80
	СтОш		0,49	0,00	0,20	0,89	0,00	3,64			
анолит/ сутки	Ср	500	0,20	0,00	0,00	0,20	0,40	22,00	3,60	0,20	7,62
	СтОш		0,20	0,00	0,00	0,20	0,40	3,62			
Контроль/ 8 суток	Ср	500	0,60	0,00	0,00	0,60	1,00	20,50			
	СтОш		0,40	0,00	0,00	0,40	0,55	2,14			
5-мин католит/ 8 суток	Ср	600	1,17	0,00	0,17	1,33	1,17	19,00	1,48	0,07	1,05
	СтОш		0,44	0,00	0,18	0,62	0,44	2,42			
20 мин католит / 8 суток	Ср	600	0,33	0,00	0,00	1,17	0,50	28,50	0,97	0,94	17,70
	СтОш		0,23	0,00	0,00	1,14	0,24	1,91			
40 мин католит/ 8 суток	Ср	609	2,17	0,00	0,00	2,17	0,83	26,33	4,55	0,00	12,60
	СтОш		0,96	0,00	0,00	0,96	0,34	5,90			
анолит / 8 суток	Ср	600	0,50	0,00	0,00	0,50	0,33	27,00	0,00	1,91	14,10
	СтОш		0,22	0,00	0,00	0,22	0,33	3,67			
контроль /	Ср	398	1,80	0,00	0,00	1,80	0,80	8,10			

Группа/ Продолжительность экспозиции	Пока- затель	Просмотрен о клеток	Клеток с фрагментами, %			Всего клеток с абберациями, %	Клеток с гепами, %	МИ / 1000 клеток	Значение X^2 (по сравнению с контролем того же срока)		
		n=40±2	один.	парные	множ.				Аберр клетки	Клетки с гепами	МИ
15 суток	СтОш		1,07	0,00	0,00	1,07	0,37	2,62			
5-мин католит / 15 суток	Ср	263	1,17	0,00	0,00	1,17	0,50	11,67	3,92	0,03	0,63
	СтОш		0,48	0,00	0,00	0,48	0,34	6,26			
20 мин католит / 15 суток	Ср	141	0,80	0,00	0,00	0,80	0,60	11,60	3,48	1,02	0,52
	СтОш		0,80	0,00	0,00	0,80	0,24	6,28			
40 мин католит/ 15 суток	Ср	355	0,67	0,00	0,00	0,67	1,33	5,67	0,28	1,86	2,79
	СтОш		0,37	0,00	0,00	0,37	0,46	1,46			
анолит / 15 суток	Ср	486	2,83	0,00	0,17	3,00	0,83	16,73	8,20	0,41	14,50
	СтОш		0,83	0,00	0,17	1,00	0,31	2,75			
Контроль/ 30 суток	Ср	500	1,20	0,20	0,20	2,60	0,40	24,00			
	СтОш		0,58	0,20	0,20	1,98	0,40	3,08			
5-мин католит / 30 суток	Ср	600	1,17	11,67	0,00	1,30	0,17	35,50	0,12	0,55	8,62
	СтОш		0,40	11,66	0,00	1,23	0,17	3,77			
20 мин католит / 30 суток	Ср	600	1,00	0,00	0,50	1,50	0,17	32,83	1,68	0,55	7,60
	СтОш		0,52	0,00	0,50	1,02	0,17	2,84			
40 мин католит/ 30 суток	Ср	600	0,67	0,00	0,67	1,50	0,17	30,33	1,68	0,55	4,10
	СтОш		0,33	0,00	0,42	0,56	0,17	2,59			
анолит / 30 суток	Ср	600	1,17	0,00	0,33	1,33	0,50	26,50	1,16	0,06	0,69
	СтОш		0,40	0,00	0,33	0,90	0,22	4,69			

Примечание:

- различия значимы при $X^2 > 1,96$ ($p \leq 0,05$) по одностороннему критерию [36]

Поскольку эксперименты по культивированию клеток крови человека показали, что активированные воды, прежде всего, оказывали влияние на пролиферативную активность, при анализе результатов, полученных в эксперименте на мышах, прежде всего, мы оценивали изменения митотического индекса (рис. 4.4.).

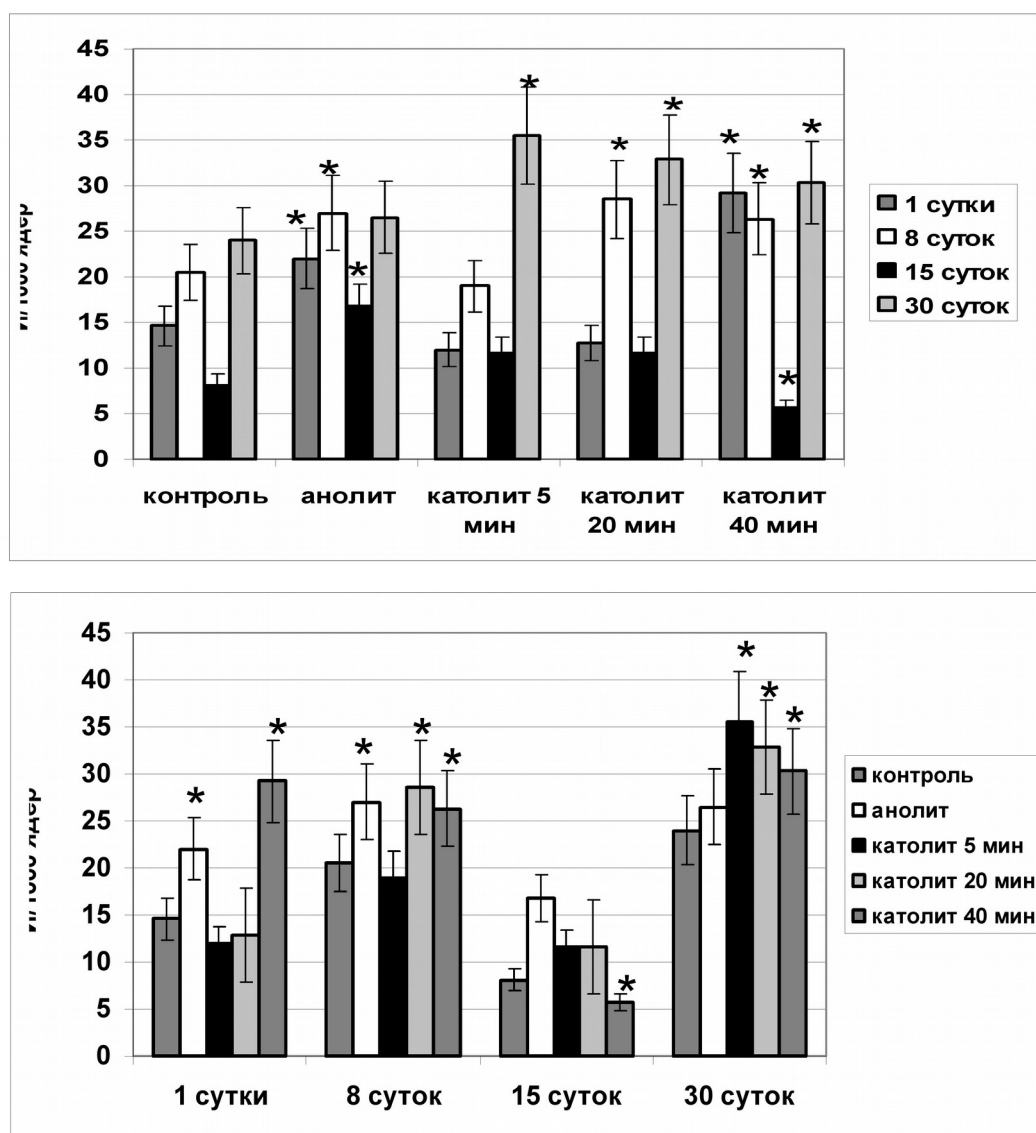


Рисунок 4.4. Митотическая активность клеток костного мозга мышей в динамике подострого эксперимента (верхняя диаграмма) и сравнение митотической активности разных вод на каждый срок эксперимента (нижняя диаграмма).

Обозначения:

Контроль – московская водопроводная вода без обработки, ОВП=226,7мВ;
 Католит 5 мин - получен при силе тока = 60 мА, время активации 5 мин, ОВП=173,7мВ;
 Католит 20 мин - получен при силе тока =60мА, время активации 20 мин, ОВП=74,0мВ;
 Католит 40 мин – получен при силе тока =60мА, время активации 40 мин, ОВП=40,7мВ;
 Анолит – получен при силе тока =60мА, время активации 40 мин, ОВП=260,0мВ

При рассмотрении этих данных, прежде всего, бросается в глаза, что на 15 сутки эксперимента митотическая активность во всех группах животных была низкой по сравнению с другими сроками, а для контроля, анолита и 40-мин. католита - ниже, чем в другие сроки эксперимента. В то же время, важно, что против контроля на данный срок (временной) снижения МИ не наблюдалось ни в одной группе животных, а на каждый срок эксперимента для разных вод наблюдалось статистически значимое повышение митотической активности клеток костного мозга мышей (рис. 4.5). Так, католит, полученный 40-мин. экспозицией, индуцировал повышение МИ на 1, 8 и 30 сутки эксперимента, анолит – на все сроки, кроме 30 суток, 20-мин. католит – только на 8 и 30 сутки, а 5-мин. католит – только на 30 сутки (рис. 4.5, табл. 4.13).

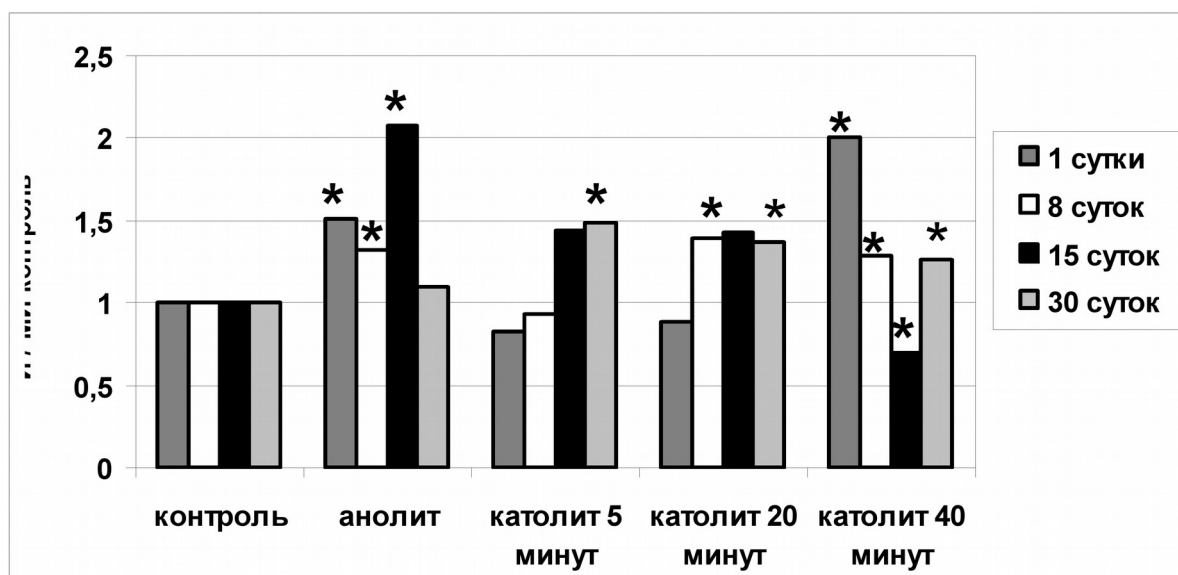


Рисунок 4.5. Изменение митотической активности клеток костного мозга в динамике эксперимента - кратность превышения над контролем.

Обозначения:

Контроль – московская водопроводная вода без обработки, ОВП=226,7мВ;

Католит 5 мин - получен при силе тока = 60 мА, время активации 5 мин, ОВП=173,7мВ;

Католит 20 мин - получен при силе тока =60мА, время активации 20 мин, ОВП=74,0мВ;

Католит 40 мин – получен при силе тока =60мА, время активации 40 мин, ОВП=40,7мВ;

Анолит – получен при силе тока =60мА, время активации 40 мин, ОВП=260,0мВ

Анализ aberrаций хромосом показал, что через 24 часа после начала выпаивания животных (рис. 4.6.) только для 5-минутного католита было обнаружено повышение частоты клеток с aberrациями, а у животных, потреблявших анолит, частота aberrантных клеток была ниже уровня контроля.

На 8 сутки опыта повышение частоты клеток с абберрациями было отмечено только в группе, потреблявшей 40-мин. католит. На 15 сутки превышение уровня контроля было обнаружено у животных, потреблявших анолит и 5-мин. католит, а у животных, потреблявших 20-мин. католит наблюдалось только снижение частоты абберрантных клеток относительно уровня временного контроля. На 30 сутки во всех экспериментальных сериях наблюдалось только изменение частоты абберрантных клеток в пределах временного контроля, поскольку ни в одной серии значимых различий с контролем обнаружено не было. Аналогичные данные об отсутствии генотоксических эффектов в микроядерном тесте на клетках костного мозга мышей СВА через 30 суток после начала выпаивания были получены Л.П.Сычевой при анализе эффектов католита, полученного на активаторе «Изумруд». Это подтверждает положение, принятое не только в РФ, но и во всем мире, о том, что в экспериментах *in vivo* необходимо анализировать генотоксические эффекты в ранние сроки после начала экспозиции.

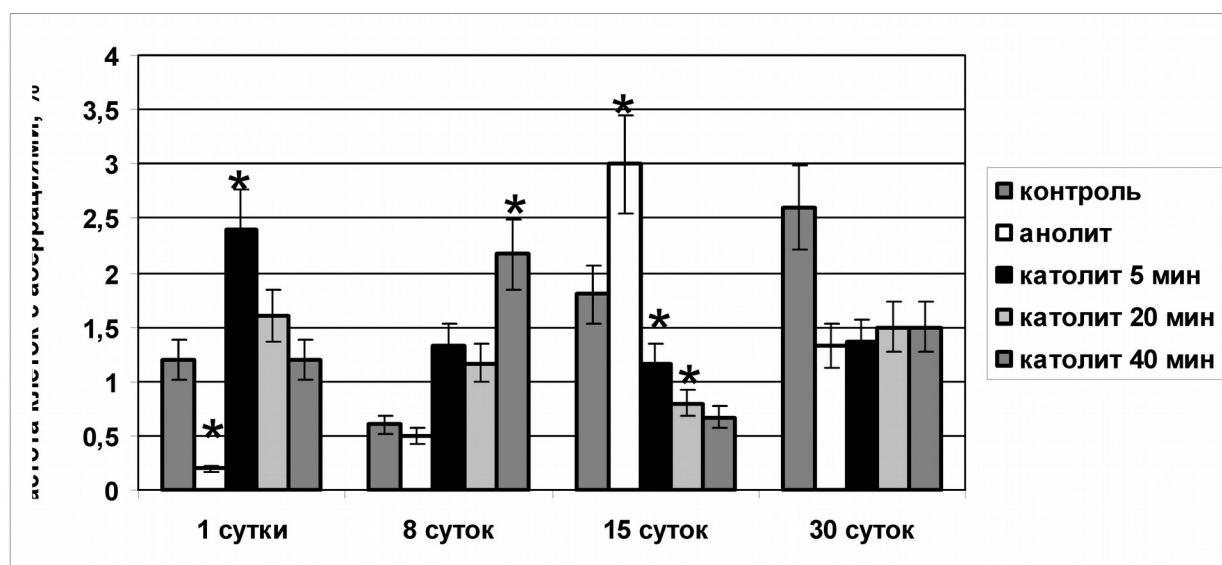


Рисунок 4.6. Частоты абберрантных клеток костного мозга мышей в динамике 30-суточного эксперимента.

Обозначения:

Контроль – московская водопроводная вода без обработки, ОВП=226,7мВ;
 Католит 5 мин - получен при силе тока = 60 мА, время активации 5 мин, ОВП=173,7мВ;
 Католит 20 мин - получен при силе тока =60мА, время активации 20 мин, ОВП=74,0мВ;
 Католит 40 мин – получен при силе тока =60мА, время активации 40 мин, ОВП=40,7мВ;
 Анолит – получен при силе тока =60мА, время активации 40 мин, ОВП=260,0мВ

Клетки с ахроматическими пробелами (гепами) обычно не входят в число хромосомных аберраций, хотя представляют собой одностебельные разрывы ДНК, которые могут возникать в результате образования апуриновых и/или апириимидиновых сайтов, индуцированных действием различных генотоксических факторов и - в частности – ионизирующей радиации [129, 132, 154, 180]

Поэтому в данном эксперименте мы дополнительно к частотам абберрантных клеток отдельно проанализировали частоту образования с гепами.

Анализ этих данных (табл. 4.14) показал, что частота клеток с гепами значимо превышала уровень контроля только в течение первых суток после начала выпаивания и только в группах мышей, потреблявших католиты, неконтактно активированные в течение 5 и 20 минут.

Таким образом, через сутки после начала эксперимента во всех группах животных, потреблявших католиты, наблюдалось повышение частоты абберрантных клеток либо клеток с гепами, что в двух группах – потреблявших 40-мин. католит и анолит - сопровождалось повышением митотической активности. Через 8 суток генотоксические эффекты были обнаружены только у животных, потреблявших 40-мин. католит, но стимуляция пролиферации наблюдалась уже в 3 случаях – для 20- и 40-мин. католитов и для анолита. На 15 сутки повышение частоты абберрантных клеток относительно временного контроля было отмечено только у животных, потреблявших анолит, причем этот эффект сопровождался увеличением митотической активности. На 30 сутки во всех группах мышей, потреблявших католиты, было отмечено повышение митотической активности, не сопровождавшееся изменением частоты генетических повреждений. Митотическая активность во всех группах, потреблявших католит, была выше временного контроля, что говорит о стимуляции пролиферации, что на фоне обнаружения повышенной частоты клеток с аберрациями и гепами говорит о возможности закрепления существующих генетических повреждений в поколениях делящихся клеток. Несмотря на то, что таких клеток с генетическими

повреждениями, прошедшими митоз, мало, каждая из них может стать источником опухолевой трансформации генома.

Несмотря на то, что все обнаруженные генотоксические эффекты были в пределах колебания исторического контроля, определенного по результатам анализа большого числа экспериментов, они были значимы по отношению к временным контролям данного эксперимента.

Важно, что объем воды, выпитой животными, прямо коррелировал с частотами аберрантных клеток и клеток с гепами (в обоих случаях $r=0,78$; $p=0,013$). Это позволяет отнести указанные эффекты к индуцированным НАВ. Поэтому ситуацию, подобную зафиксированной на 15 и 30 сутки, нельзя трактовать как позитивный эффект потребления неконтактно активированных вод.

Кроме того, следует отметить, что водопотребление во всех опытных группах в начале эксперимента было выше, чем в контроле, но заметно снижалось в последующие сроки (рис. 4.7). В то же время, в контрольной группе мышей водопотребление варьировало незначительно и не имело выраженной динамики.

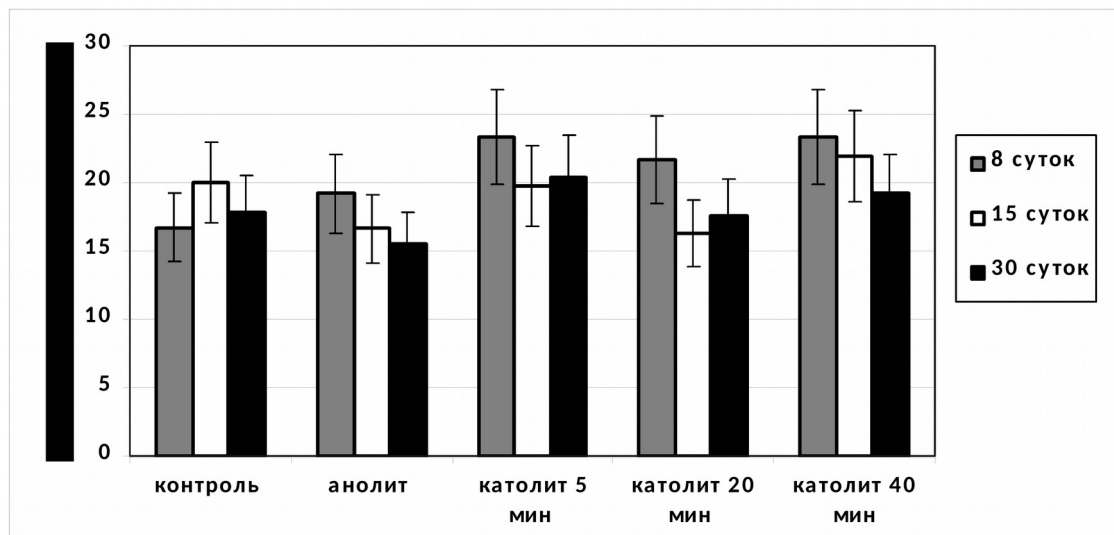


Рисунок 4.7. Динамика водопотребления мышами неконтактно активированных вод, приготовленных на московской водопроводной воде
Обозначения:

Контроль – московская водопроводная вода без обработки, ОВП=226,7мВ;
Католит 5 мин - получен при силе тока = 60 мА, время активации 5 мин, ОВП=173,7мВ;
Католит 20 мин - получен при силе тока =60мА, время активации 20 мин, ОВП=74,0мВ;
Католит 40 мин – получен при силе тока =60мА, время активации 40 мин, ОВП=40,7мВ;
Анолит – получен при силе тока =60мА, время активации 40 мин, ОВП=260,0мВ

То есть, в опыте на мышах как и в экспериментах на культуре клеток крови человека, в мы наблюдали как повышение митотической активности, так и ее снижение, равно как и повышение и снижение частот клеток с повреждениями.

Очень важно, что в группах животных, потреблявшие разные НАВ проявилась различная динамика соотношения основных цитогенетических показателей теста - частот аберраций хромосом и митотической активности (рис. 4.8).

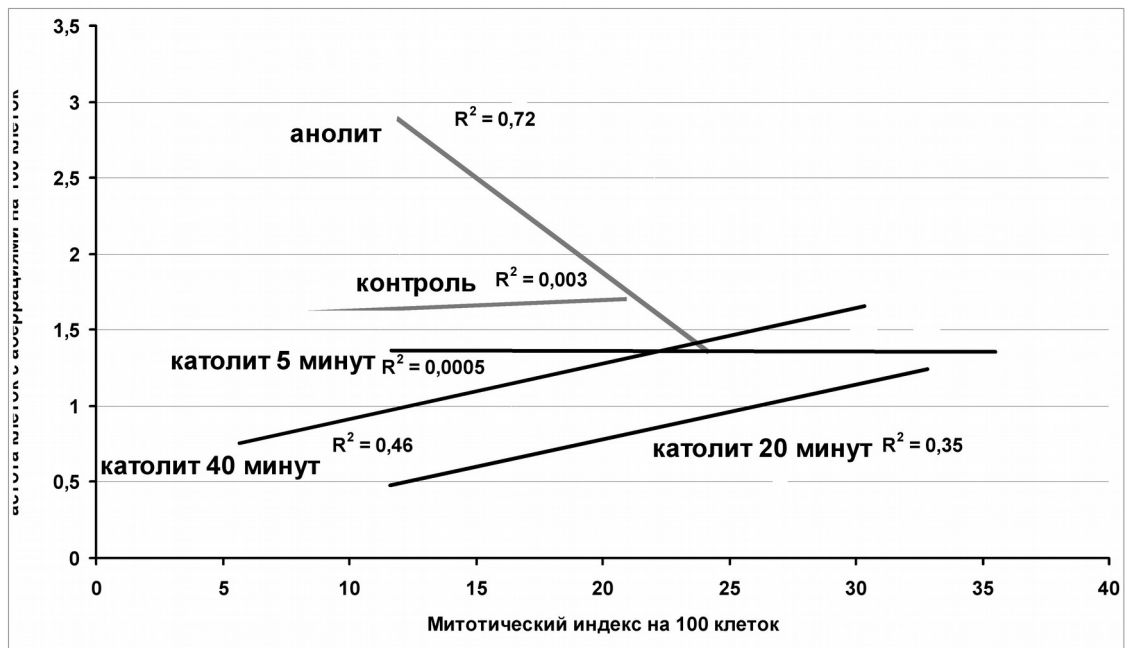


Рисунок 4.8. Соотношение частоты аберраций хромосом и митотической активности в группах животных, потреблявших различные НАВ - линейные тренды

Анализ этих данных показал, что при выпаивании мышей неактивированной водой (контроль), зависимости между частотой абберантных клеток и изменением митотической активности обнаружено не было. В то же время, для анолита и 5-мин. католита увеличение частоты клеток с аберрациями сопровождалось снижением митотической активности, что обычно наблюдается под действием генотоксикантов (при запуске процессов репарации генетических повреждений, индуцированных химическими мутагенами и ионизирующей радиацией, происходит задержка продвижения клетки в митотическом цикле [139, 145, 173]. Для 20- и 40-мин. католитов наблюдалась противоположная закономерность – с увеличением частоты абберантных клеток митотическая активность клеток

костного мозга увеличивалась, что описано для канцерогенов [170]. Феномен увеличения митотической активности на фоне повышения уровня генетических повреждений на разных экспериментальных моделях и группах добровольцев описан для аэроионов [29, 43] и для наночастиц [133, 142], а также наблюдался в популяционных цитогенетических обследованиях разных групп детей и взрослых, живущих в состоянии неадаптивного эмоционального стресса [45, 148].

Анализ влияния физико-химических свойств НАВ, приготовленных на московской водопроводной воде, на индукцию генотоксических эффектов в культуре крови человека и в клетках костного мозга мышей показал, что при использовании в одной матрице всех вод (католитов и анолита), показатели пролиферативной активности клеток в культуре не коррелировали с частотой поврежденных клеток ($r = -0,29$; $p=0,63$). Однако между этими показателями имеется логическая связь: в католитах с увеличением частоты поврежденных клеток пролиферативная активность культуры снижалась, что может быть вызвано активизацией систем репарации клеток и связанным с этим блоком пролиферативной активности (рис. 4.9). В то же время, для культур, выращенных в реконструированных средах на неактивированной воде (контроль) и на анолите, между этими же показателями была обнаружена обратная связь.

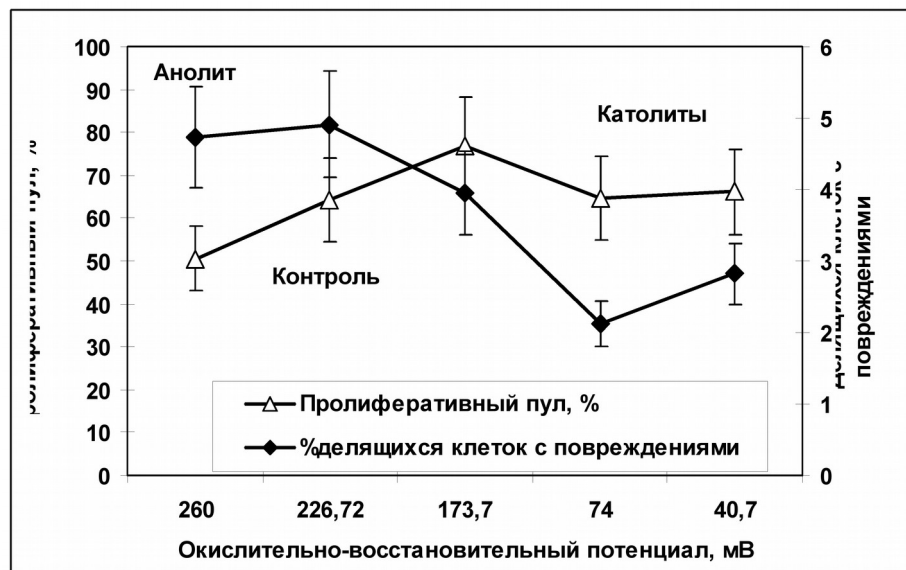


Рисунок 4.9. Связь между показателями пролиферации и повреждения клеток крови человека, культивируемых в реконструированных средах на НАВ, приготовленных на основе московской водопроводной воды

Результаты, полученные в результате подобного анализа в экспериментах на мышах показаны на рис. 4.8, где хорошо видно воспроизводимые закономерности: снижение частоты аберрантных клеток с увеличением митотической активности при выпаивании мышей анолитом и увеличение частоты аберрантных клеток с увеличением митотической активности при выпаивании 20- и 40 мин. католитами. И аналогичные зависимости мы наблюдали при культивировании клеток крови человека в реконструированных средах, приготовленных на НАВ на основе осмотической воды (рисунок 3.4), что подчеркивает неслучайный характер обнаруженных связей.

Обобщая полученные данные, следует отметить, что при длительном выпаивании мышам неконтактно активированных вод, приготовленных на основе московской водопроводной воды, в костном мозге животных наблюдалось как снижение (5-мин. католит на 15 сутки эксперимента и 20-мин. католит на 15 сутки), так и повышение (5-мин. католит 1 сутки, 40-мин. католит на 8 сутки, анолит на 1 и 15 сутки) частоты метафаз с абберациями хромосом. Кроме того, в большинстве экспериментальных групп было отмечено превышение уровня временного контроля по митотической активности.

При выпаивании мышей водой, не подвергавшейся активации, частоты аберрантных клеток не изменялись с изменением митотической активности. Для анолита и в существенно меньшей степени для 5-мин. католита увеличение частоты клеток с абберациями сопровождалось снижением митотической активности, характерное для действия генотоксикантов, а для 20- и 40-мин. католитов наблюдалась противоположная закономерность — с увеличением частоты аберрантных клеток митотическая активность клеток костного мозга увеличивалась. Последнее наблюдение свидетельствует о закреплении генетических повреждений в поколениях делящихся клеток.

То есть, результаты субхронического эксперимента на мышах показали, что адаптация животных к неконтактно активированным водам сопровождалась индукцией генетических повреждений в клетках костного мозга, причем в

большинстве групп животных эти процессы сопровождались повышением митотической активности.

Поскольку генотоксические эффекты НАВ в эксперименте на мышах были обнаружены только через сутки и 8 суток после начала выпаивания, а не через 15 и 30 суток, следует заключить, что продолжительность экспериментов по изучению генотоксического действия НАВ на мышах *in vivo* следует сократить до 5-8 суток, что согласуется с рекомендациями, принятыми в РФ и странах ОЭСР.

Цитогенетические эффекты одной и той же воды, изученные на разных объектах (мыши *in vivo* и лимфоциты крови человека *in vitro*), дали близкие результаты, что позволяет сделать заключение о том, что культура клеток крови человека является адекватной моделью для прогноза генотоксических эффектов в экспериментах на животных.

4.4. Оценка генотоксических эффектов в половых клетках

Drosophila melanogaster

Обнаружение генотоксического действия НАВ в экспериментах на соматических клетках *in vitro* и *in vivo* позволило предположить возможность индукции генетических повреждений и в половых клетках. Дорогие и долгие эксперименты на лабораторных грызунах, мы заменили опытами на *Drosophila melanogaster* – одним из наиболее изученных объектов генетических исследований. Тест на индукцию доминантных летальных мутаций в половых клетках самцов дрозофилы (ДЛТ) является аналогом соответствующего теста на лабораторных грызунах и обладает близкой чувствительностью [12, 97, 101, 105, 109, 110, 111, 113, 178]. Этот метод основан на учете таких генетических повреждений в сперматозоидах самцов-родителей, которые приводят к гибели потомка, развивающегося из зиготы, оплодотворенной таким сперматозоидом, уже на стадии яйца. Это могут быть точковые мутации, делеции или потеря хромосомы. Недостатком метод является указанная множественность причин образования ранних леталей, что, однако, не мешает обнаружению генотоксической активности. Высокая предсказательная сила тестов на дрозофиле

обеспечивается не менее чем 60% уровнем гомологии с генами человека. Кроме того, в геноме дрозофилы имеются около 75% генов болезней человека, а более 50% белков дрозофилы гомологичны соответствующим белкам млекопитающих [53]. ДЛТ обладает высокой чувствительностью, прост в исполнении, экономичен, обладает уникальной возможностью изучать эффекты на очень больших выборках эукариотических организмов, что выгодно отличает его от аналогичного теста на млекопитающих. Важно, что этот тест рекомендован для прогноза канцерогенной активности [39,174, 177]. Физико-химические свойства НАВ, использованных в эксперименте, приведены в табл. 4.18.

Таблица 4.18. Физико-химические свойства НАВ на основе московской водопроводной воды, использованные для экспозиции самцов *Drosophila melanogaster*

	Условия активации: сила тока (при получении контактно активированных вод) и время активации (при получении неконтактно активированных вод)	Окислительно- восстановительный потенциал ОВП, мВ	Электропровод- ность S, мкСм/см
Контроль		322,00	391,5
Анолит	60мА...40 мин	274,95	390,5
Католиты	60мА...5 мин	58,765	379,5
	60мА...20 мин	-16,55	385,5
	60мА...40 мин	-62,90	384,0

Результаты экспериментов на дрозофиле (рис. 4.10) показали, что фертильность самцов изменялась в динамике эксперимента, а также между группами по общему количеству отложенных яиц (табл. 4.19). При этом от контроля отличалась только одна группа – самцы которой потребляли католит, полученный при 5-мин. длительности экспозиции.

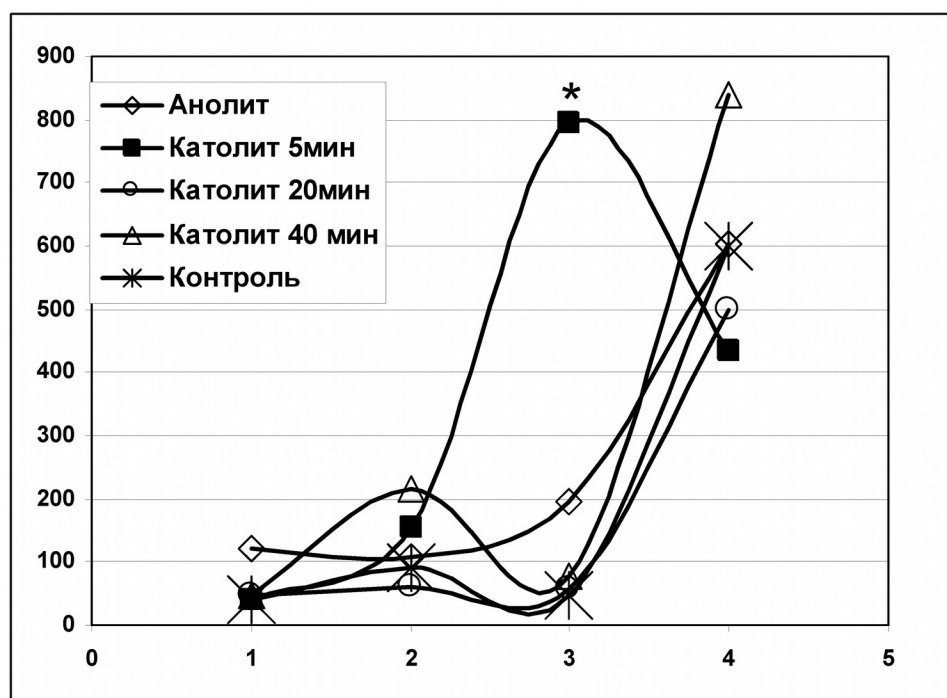


Рисунок 4.10. Динамика откладки яиц самками *Drosophila melanogaster* после скрещивания с самцами, экспонированными различными БАВ. По оси абсцисс – повторность опыта, по оси ординат – количество отложенных яиц.

Анализируя эти данные, прежде всего, следует отметить, что во всех группах, кроме той, самцы в которой были экспонированы католитом, полученным при 20-минутной экспозиции, количество отложенных яиц значительно превышало уровень контроля. Но это повышение фертильности никак не отразилось на частотах ранних (РЭЛ) и поздних (ПЭЛ) эмбриональных леталей. В то же время, на фоне 15% снижения фертильности самцов, потреблявших 20-мин. католит, наблюдалось существенное увеличение частоты ПЭЛ по сравнению с контролем и его доли в спектре мутационных событий, что свидетельствует о наличии мутагенного действия у этой воды. И это наблюдение позволяет сделать заключение о высокой вероятности индукции аналогичных эффектов в половых клетках животных и человека.

Таблица 4.19. Влияние неконтактно электрохимически активированных вод на фертильность самцов дрозофилы и частоты доминантных летальных мутаций в их половых клетках

Вода, условия активации	ОВП воды, 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	$8,38 \pm 0,10$	$0,52 \pm 0,10$	0,94	0,06
Анолит	275,0	1029	132,60**	$8,94 \pm 0,10$	$0,58 \pm 0,10$	0,94	0,06
Католит 5 мин	58,8	1425	183,63**	$6,67 \pm 0,16$	$0,63 \pm 0,16$	0,91	0,09
Католит 20 мин	-16,6	663	85,44*	$3,62 \pm 0,20$	$0,90^* \pm 0,20$	0,80	0,2*
Католит 40 мин	-62,9	1179	151,93**	$5,00 \pm 0,20$	$0,25 \pm 0,20$	0,95	0,05

Примечание:

*) различия с контролем значимы, $p \leq 0,05$

**) различия с контролем значимы, $p \leq 0,01$

Корреляционный анализ не выявил связи между количеством отложенных яиц и частотами РЭЛ, в то время как для частот ПЭЛ с фертильностью самцов была обнаружена обратная корреляция ($r = -0,74$; $p \leq 0,05$).

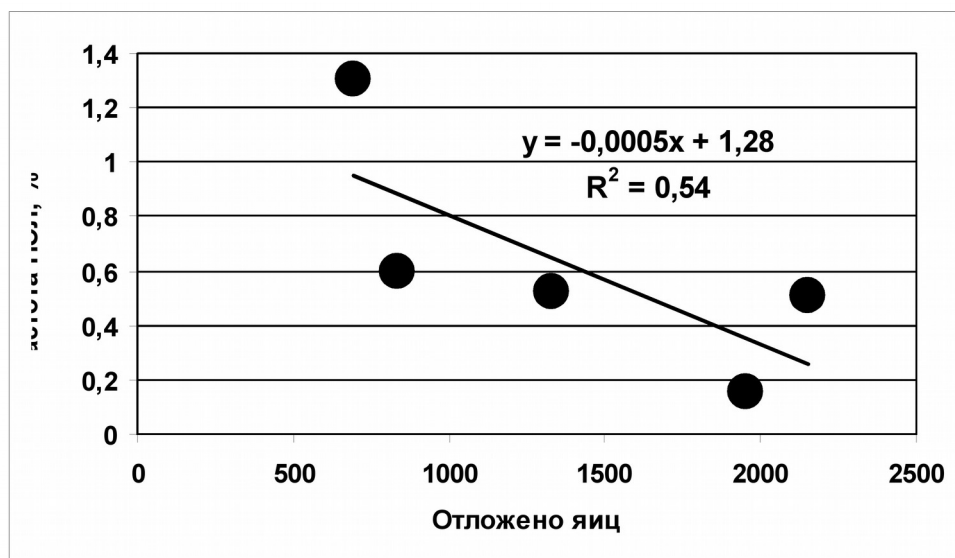


Рисунок 4.11. Связь между фертильностью самцов мух и частотами ПЭЛ

Таким образом, результаты эксперимента показали, что при потреблении самцами *Drosophila melanogaster* всех изученных НАВ, за исключением 20-мин.

католита, наблюдалось повышение фертильности, что, тем не менее, не влекло за собой изменение частоты доминантных летальных мутаций в половых клетках мух. В то же время, потребление 20-мин. католита самцами мух сопровождалось статистически значимым снижением фертильности, повышением частоты поздних эмбриональных леталей в половых клетках мух и увеличением доли этих мутаций в спектре мутационных событий, что позволяет классифицировать обнаруженный эффект как генотоксический.

4.5. Заключение по главе

Эксперименты по изучению влияния НАВ, приготовленных на основе московской водопроводной воды, выявили повреждающее действие на генетические структуры лимфоцитов крови человека, культивированных в условиях цитокинетического блока, клетки костного мозга мышей при 30-суточном выпаивании *ad libitum* и половые клетки самцов дрозофилы. Кроме того, была доказана релевантность использования результатов оценки нестабильности генома клеток крови человека в реконструированных средах на основе НАВ в расширенном варианте микроядерного теста для качественного прогноза результатов подострого эксперимента на мышах *in vivo*.

Таким образом, все изученные НАВ индуцировали мутагенные, генотоксические и/или другие эффекты нестабильности генома на одном или нескольких тест-объектах, рекомендованных в РФ и странах ОЭСР для выявления генотоксической активности химических соединений, фармакологических препаратов, продуктов питания и пр., хотя степень выраженности этих эффектов относительно контроля была различной для разных вод и в разных тестах.

ГЛАВА 5. ИНДУКЦИЯ ЭФФЕКТОВ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА КЛЕТОК КРОВИ ЧЕЛОВЕКА НЕКОНТАКТНО АКТИВИРОВАННЫМИ ВОДАМИ НА ОСНОВЕ БУТИЛИРОВАННОЙ ВОДЫ «ПИЛИГРИМ»

В предыдущих главах мы показали, что НАВ на основе воды с низкой степенью минерализации (осмотической) или водопроводной воды, которые с высокой вероятностью могут быть использованы для приготовления НАВ в быту, индуцировали генотоксические эффекты на живых тест-объектах *in vitro* и *in vivo*. В настоящее время среди населения все большее распространение получают бутилированные питьевые воды с различной минерализацией, которые также могут быть использованы для приготовления НАВ. Поэтому на следующем этапе работы мы проанализировали возможность индукции генотоксических эффектов НАВ, приготовленных на основе минеральной бутилированной воды «Пилигрим». Активацию проводили в тех же условиях, что и для московской водопроводной воды (физико-химические свойства этой воды показаны в табл. 5.1).

Таблица 5.1. Физико-химические свойства НАВ,
приготовленных на основе бутилированной воды «Пилигрим»

	Условия активации: сила тока (при получении контактно активированных вод) и время активации (при получении неконтактно активированных вод)		Окислительно- восстанови- тельный потенциал ОВП, мВ	Водород- ный показатель рН, усл.ед	Светосумма хемилюмине- сценции *10 ⁴ , усл.ед	Доля структурированной (связанной) фазы в воде, q	
						Среднее, %	Вариация Var.
	Контроль		356,02	7,79	0,32	0,269	0,071
катодиты	60 мА	5 мин	275,25	7,63	0,098	0,326	0,086
	60 мА	20 мин	168,90	7,61	0,014	0,293	0,035
	60 мА	40 мин	105,0	7,55	0,012	0,286	0,116
анодит	60 мА	40 мин	224,40	7,35	0,015	0,429	0,024

Проверку генотоксичности НАВ на основе воды «Пилигрим» проводили в наиболее быстром тесте на индукцию микроядер на культуре лимфоцитов крови человека.

Результаты этого эксперимента показаны в табл. 5.2-5.5. Для их адекватного понимания следует учитывать, что спектр клеточных популяций свидетельствует о скорости деления клеток – чем большее количество клеток, прошедших за время культивирования с цитохалазином В один (двухядерные клетки), два (трех- и четырехядерные клетки) и более митотических циклов (полиядерные клетки), обнаруживается в культуре, тем выше пролиферативный пул. Косвенная оценка скорости прохождения клетки по циклу определяется соотношением частот клеток, прошедших один и более циклов деления – чем больше клеток, прошедших два и более циклов деления, тем большая доля клеток имеет укороченный клеточный цикл.

Таблица 5.2. Спектр клеточных популяций в культурах клеток крови человека в реконструированных средах с использованием НАВ на основе бутилированной воды «Пилигрим»

Вода, условия активации	% 1-ядерных клеток в популяции	% 2-ядерных клеток	% 3-ядерных клеток	% 4-ядерных клеток	%3-ядерных клеток / % 4-ядерных клеток	% полиядерных клеток
Контроль	58,67	30,41	2,53	2,92	0,87	0,19
Католит 5 мин	79,19**	14,18**	2,03	0,37**	5,48	0,18
Католит 20 мин	52,20*	26,20	5,20	4,20	1,24	0,40
Католит 40 мин	41,6**	35,80	3,40	6,20**	0,55	0,80
Анолит	48,43**	29,22	5,10	7,25**	0,70	1,37*

Примечание:

*) значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$

**) значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,01$

Как видно, продолжительность активации вод по-разному влияла на скорость пролиферации клеток: 5-минутный католит значительно снижал долю клеток, вступивших в деление, о чем свидетельствует существенное повышение частоты одноядерных клеток по сравнению с контролем ($X^2 = 52,11$). Соответственно, в этой культуре насчитывалось меньшее, чем в контроле количество клеток, прошедших один и 2 митотических цикла, что говорит о снижении скорости деления клеток. В то же время, католиты, полученные при более длительной продолжительности экспозиции к активированной воде (20 минут и 40 минут) стимулировали клетки к делению (большая, чем в контроле часть клеточной популяции вступила в деление, а доля одноядерных клеток была меньше, чем в контроле ($X^2 = 4,30$ и $64,22$, соответственно). Кроме того, в этих культурах мы наблюдали двукратное увеличение частоты 4-ядерных клеток по сравнению с контролем, что доказывает сокращение продолжительности клеточного цикла у большего, чем в контроле количества клеток.

Важным показателем точности распределения генетического материала в митозе является соотношение частот 3- и 4-ядерных клеток. Как видно в табл. 5.3, в реконструированной среде, приготовленной на 5-мин. католите, степень асимметрии расхождения хромосом в митозе была в 6,8 раз больше, чем в контроле, в 20-мин. католите это соотношение в 1,5 раза превышало уровень контроля, а в остальных водах отличия от контроля по этому показателю обнаружено не было. Эти данные свидетельствуют о том, что в средах на 5- и 20-мин. католитах риск опухолевой трансформации клеток, для которых особенно характерно асимметричное распределение генетического материала в митозе, значительно превышал уровень контроля.

Поведение клеток в среде, приготовленной на анолите, было ближе к 20- и 40-мин. католитам и характеризовалось значимо меньшим, чем в контроле числом одноядерных клеток и двукратным повышением доли 4-ядерных клеток в спектре клеточных популяций.

Таблица 5.3. Характеристика пролиферативной активности в культурах клеток крови человека, приготовленных на неконтактно активированных водах на основе бутилированной воды «Пилигрим»

Вода, условия активации	Митотическая активность, %	% делящихся клеток в популяции	% ускоренно делящихся клеток	Индекс репликации, ед.	Индекс пролиферации, ед.	Асимметрия деления во 2-м митозе ^а , ед.
Контроль	3,12	36,06	5,65	1,39	1,36	0,87
Католит 5 мин	1,10*	16,76**	2,58*	1,15	1,15	5,50
Католит 20 мин	7,00**	36,00	9,80*	1,37	1,34	1,24
Католит 40 мин	3,00	46,20**	10,40**	1,48	1,44	0,55
Анолит	4,31	42,94**	13,73**	1,51	1,48	0,70

Примечание:

^а) соотношение частот 3-х и 4-х ядерных клеток

*) значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$

**) значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,01$

Митотическая активность клеток в культуре, приготовленной на 5-мин. католите была ниже, чем в контроле ($X^2=4,65$), а в 20-мин. – вдвое выше, чем в контроле ($X^2=7,98$), что качественно воспроизводит результаты, полученные при анализе спектра клеточных популяций. Та же закономерность следует и из анализа численности фракций ускоренно делящихся клеток, которые в культурах на 20- и 40-мин. католитах, а также на анолите были в значительно больше, чем в контроле ($X^2=5,13$, $6,39$ и $16,38$, соответственно).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что 5-мин. католит значительно снижал пролиферативную активность клеток в культуре и увеличивал продолжительность клеточного цикла, в то время как католиты, полученные при более длительной активации, как и анолит, стимулировали клетки к делению и сокращали продолжительность клеточного цикла. Уменьшение длительности клеточного цикла при экстраполяции полученных данных на организм позволяет предположить его ранее старение.

Таблица 5.4. Частоты клеток с повреждениями в культурах крови человека на неконтактно активированных водах на основе бутилированной воды «Пилигрим»

Вода, условия активации	% 2-ядерных клеток с МЯ	% 2-ядерных клеток с НПМ	% 3-ядерных клеток с МЯ	% 3-ядерных клеток с НПМ	% 4-ядерных клеток с МЯ	% 4-ядерных клеток с НПМ	% полиядерных клеток с МЯ	% полиядерных клеток с НПМ
Контроль	2,38	0,30	7,69	0,00	6,67	13,33	0,00	0,00
Католит 5 мин	2,30	0,50	18,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Католит 20 мин	3,30	1,00**	11,54	7,69	28,57	19,05	1,00	0,00
Католит 40 мин	2,19	0,80	23,53	0,00	19,35	9,68	0,00	0,00
Анолит	3,08	1,49**	30,77	7,69	29,73	27,03	4,00	28,57

Примечание:

*) значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$

**) значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,01$

Поскольку в реконструированных средах на НАВ на основе воды «Пилигрим» относительно небольшое количество клеток за время культивирования прошло более одного цикла деления, при анализе данных особое внимание следует уделить повреждениям, обнаруженным в 2-ядерных клетках (разделившихся за время культивирования 1 раз). Как видно в табл. 5.3, в культурах, приготовленных на 20-мин. католите и на анолите, частоты 2-ядерных клеток с нуклеоплазмными мостами в 3 и 5 раз превышали уровень контроля ($X^2 = 3,86$ и $8,13$, соответственно). Важно понимать, что нуклеоплазмный мост является долгоживущим повреждением – такая клетка (в отличие от клетки, содержащей микроядро) может пройти достаточное количество клеточных циклов, а имеющаяся в ней мутация (мутации), приведшая к образованию aberrаций обменного типа - ошибочная репарация двунитевых разрывов ДНК, может стать причиной серьезных биохимических изменений [104].

Следует отметить, что, кроме указанных повреждений, в среде, приготовленной на 20-мин. католите, мы наблюдали более чем 4-кратное повышение частоты клеток с множественными микроядрами ($X^2 = 4,55$), что свидетельствует о наличии множественных генетических повреждений.

Таблица 5.5. Интегральные показатели генетических повреждений в культурах клеток крови человека, приготовленных на неконтактно активированных водах на основе бутилированной воды «Пилигрим»

Вода, условия активации	% двуядерных клеток с повреждениями	% делящихся клеток с повреждениями	% ускоренно делящихся клеток с повреждениями	Частота апоптоза, %
Контроль	2,67	2,98	13,79	2,14
Католит 5 мин	2,79	2,95	14,29	2,95
Католит 20 мин	4,3*	5,62**	32,65	4,80
Католит 40 мин	2,99	4,07	25,00	9,20**
Анолит	4,58*	7,72**	52,86**	4,31

Примечание:

*) значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$

**) значимо по сравнению с контролем, $p \leq 0,01$

О негативном влиянии НАВ на основе бутилированной воды «Пилигрим» на генетические структуры культивированных клеток человека свидетельствуют и данные табл. 5.5, где приведены сведения о наличии в клетках генетических повреждений. Так, католит, полученный при 20-минутной экспозиции, вызывал не только повышение частоты двуядерных клеток с генетическими повреждениями (микроядрами и нуклеоплазменными мостами, $X^2=3,96$), но и повышение суммарной частоты делящихся клеток с повреждениями ($X^2=7,30$). В то же время, для католита, полученного 40-мин. экспозицией, отсутствие различий с контролем по частоте клеток с генетическими повреждениями сочеталось почти 5-кратным повышением частоты апоптоза. Поскольку апоптоз в большинстве случаев связан с индукцией нерепарируемых повреждений ДНК, повышение его частоты, как правило, характеризует наличие таких повреждений.

При обобщении данных, представленных в таблице 5.5, с учетом показателей пролиферации клеток в культуре можно сказать, что наблюдение большого числа клеток с генетическими повреждениями для 20-мин. католита и высокой частоты апоптоза для 40-мин. католита суть проявления единого процесса становления и

элиминации генетических повреждений, только зафиксированные на разных стадиях развития процесса.

Таким образом, инкубация клеток крови человека в реконструированных средах на основе минеральной воды «Пилигрим» вызывала множественные изменения, характеризующие индукцию эффектов нестабильности генома, причем действие католитов и анолита существенно различались (что было обнаружено при анализе данных всех ранее поставленных экспериментов). Следует также отметить, что дозовых зависимостей эффектов нестабильности генома от окислительно-восстановительного потенциала католитов обнаружено не было.

ГЛАВА 6. АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ НЕКОНТАКТНО АКТИВИРОВАННЫХ ВОД НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ *E.Coli* И *B.Sereus*

Бактерицидная активность контактно электрохимически активированных вод была неоднократно описана [11, 49, 56, 82, 153]. 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 и *B.cereus* IP 5832 (аптечный препарат «Бактисубтил»). Культивируемые условно-патогенные штаммы *E.Coli* хорошо растут в лабораторных условиях и поэтому широко используется в качестве модельного организма в микробиологических исследованиях [155]. Непатогенный штамм *B.cereus* IP 5832 (ATCC 14893) применяется как антидиарейный микроорганизм для восстановления кишечной микрофлоры, является мощным антагонистом неродственных патогенных и условно-патогенных бактерий за счет продукции лизоцима, протеолитических ферментов и бактериоцинов [73].

В каждом эксперименте подбирали условия неконтактной активации таким образом, чтобы полученные воды имели физико-химические параметры, близкие к НАВ, использованных в экспериментах на культуре клеток крови человека и для выпаивания мышей.

Измерения физико-химических параметров НАВ, приготовленных на основе осмотической воды г.Самара, выявили существенные различия в значениях ОВП в повторных экспериментах, поставленных в течение небольшого периода времени, хотя активация и все измерения проводились в одинаковых условиях. В то же время, значения pH и электропроводность изменялись мало (табл. 6.1).

При 2-часовой экспозиции к НАВ жизнеспособность бактерий уменьшалась со снижением ОВП вод. Близкая динамика выживаемости бактерий была обнаружена при культивировании бактерий в течение 24-часов, за исключением 20-минутного

католита, при культивировании в котором наблюдалось значимое повышение выживаемости ($X^2=8,05$).

Таблица 6.1. Изменение физико-химических показателей НАВ на основе осмотической воды в экспериментах, поставленных в близкие сроки

Образец, продолжительность неконтактной активации	ОВП, мВ			рН, усл.ед.			Электропроводность S, мкСм/см		
	26.07. 2013	7.08. 2013	14.08. 2013	26.07. 2013	7.08. 2013	14.08. 2013	26.07. 2013	7.08. 2013	14.08. 2013
Контроль	191,72	220,1	237,43	7,50	7,48	7,48	26	20,6	18,7
Католит 20 мин	-	-	46,97	-	-	7,80	-	-	21,2
Католит 40 мин	-3,86	110,35	0,21	7,36	7,27	7,52	23,2	24,47	18,45
Католит 60 мин	-	-	- 10,48	-		7,35	-	-	18,4

При проведении экспериментов по выживаемости E.Coli 1257 в НАВ на основе водопроводной воды (г.Самара) также наблюдалась аналогичная значительная вариабельность физико-химических показателей (табл. 6.2) что сопровождалось значительным изменением жизнеспособности бактерий E.Coli 1257.

Таблица 6.2. Вариабельность физико-химических показателей НАВ основе водопроводной воды г.Самара в экспериментах, поставленных в близкие сроки

Образец, продолжительность неконтактной активации	ОВП, мВ			рН, усл.ед.			Электропроводность S, мкСм/см		
	04.09. 2013	12.09. 2013	20.09. 2013	04.09. 2013	12.09. 2013	20.09. 2013	04.09. 2013	12.09. 2013	20.09. 2013
Контроль (без активации)	192,09	247,48	166,33	8,89	8,4	9,19	437,75	457,75	440
Анолит	187,20	277,86	154,79	8,66	8,17	9,01	440,5	476	436,4
Католит 5 мин	94,71	78,84	64,97	8,83	8,33	9,19	444,6	461,2	433
Католит 20 мин	5,02	-7,68	12,42	8,75	8,38	9,14	443,75	470,4	431
Католит 40 мин	-39,69	-36,19	-23,12	8,77	8,23	9,16	434,5	456,25	435

Результаты трех последовательных экспериментов выявили плохую воспроизводимость результатов (рис.6.1)



Рисунок 6.1. Выживаемость *E.coli* 1257 при 2-часовой инкубации 10^4 клеток/мл в НАВ на основе водопроводной воды г.Самара - результаты трех последовательных экспериментов.

Далее были проведены два последовательных эксперимента с *B.cereus* IP 5832 на осмотической воде (г.Самара). Экспозицию бактерий в НАВ проводили в течение 5, 15 и 45 минут. Как видно из табл.6.3, физико-химические показатели НАВ в этих эксперимента были близки, тем не менее, зависимости между временем экспозиции и количеством выживших бактерий выявлено не было и воспроизводимость результатов также была неудовлетворительной (рис.6.2).

Таблица 6.3. Физико-химические свойства НАВ на основе осмотической воды г.Самара, использованных для культивирования *B.cereus* IP 5832, выделенных из препарата «Бактисубтил»

Образец, продолжительность неконтактной активации	ОВП, мВ		рН, усл.ед		Электропроводность S, мкСм/см	
	16.10. 2013	25.10. 2013	16.10. 2013	25.10. 2013	16.10. 2013	25.10. 2013
Контроль (без активации)	321,07	343,41	7,12	6,78	19,8	16,37
Анолит	307,16	358,43	6,63	6,59	19,4	15,7
Католит 5 мин	124,63	152,49	7,04	6,86	19,43	15,8
Католит 20 мин	77,01	28,51	7,11	6,86	18,97	15,4
Католит 40 мин	3,14	4,01	7,03	6,87	19,6	15,8



Рисунок 6.2. Выживаемость *V.cereus* IP 5832 при 5-минутной инкубации 10^4 клеток/мл в НАВ на основе осмотической воды г.Самара - результаты двух последовательных экспериментов

Для культивирования *V.cereus* IP 5832 на НАВ, приготовленных на основе водопроводной воды (г.Самара) при тех же режимах активации были получены отличные от предыдущих значения ОВП НАВ (табл.6.4), но также не было обнаружено зависимости выживаемости бактерий от времени экспозиции.

Таблица 6.4. Физико-химические свойства НАВ на основе водопроводной воды г.Самара, использованных для культивирования *V.cereus* IP 5832, выделенных из препарата «Бактисубтил» 13.11.2013г.

Образец, продолжительность неконтактной активации	ОВП, мВ	pH, усл.ед	Электропроводность S, мкСм/см
Контроль (без активации)	234,55	9,12	403
Анолит	187,80	8,84	402,5
Католит 5 мин	15,85	9,14	404,67
Католит 20 мин	-39,59	8,68	406,3
Католит 40 мин	-71,81	8,62	404,3

На рис. 6.3 представлены обобщенные данные по зависимости выживаемости бактериальных штаммов *E.Coli* и *V.Cereus* от ОВП НАВ.

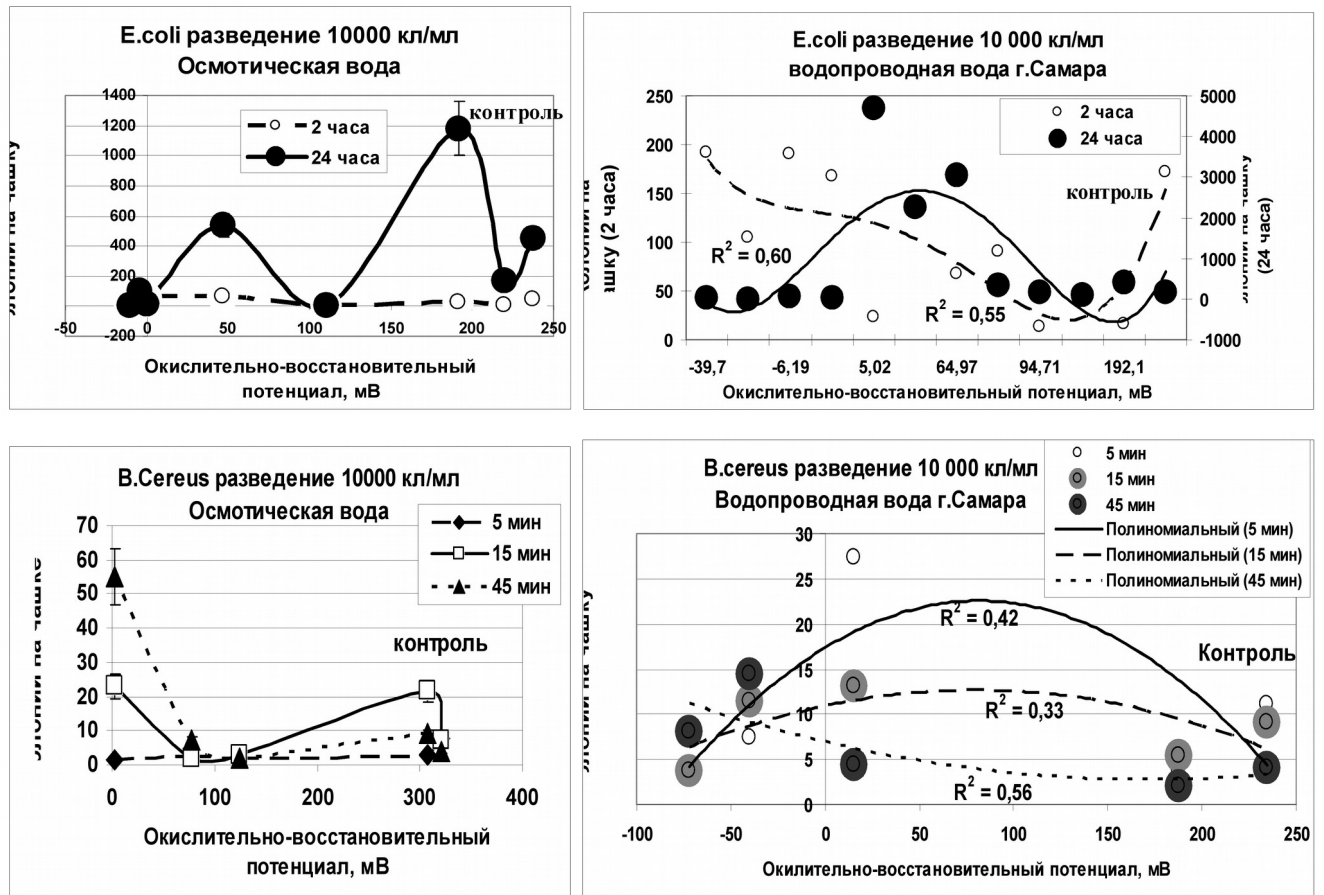


Рисунок 6.3. Влияние окислительно-восстановительного потенциала НАВ на жизнеспособность бактерий в экспериментах.

Следует отметить, что только для *B. cereus*, культивируемой на НАВ из осмотической воды была обнаружена зависимость от ОВП НАВ. Поэтому, так как осмотическая вода более стабильна по составу, чем водопроводная, следует предположить, что на физико-химические свойства активированных вод и контроля, и, следовательно, на жизнеспособность бактерий, оказывало влияние не только ОВП, но какие-то другие неучтенные свойства активированной воды.

Обобщая данные, полученные в экспериментах на бактериях, следует отметить очень низкую воспроизводимость как значений ОВП, так и результатов эксперимента. Возможно, это обусловлено нестабильностью физико-химических характеристик НАВ, связанных с особенностями активации и релаксации во времени.

В результате экспериментов на *E. coli* также были выявлены разнонаправленные эффекты НАВ (как анолитов, так и католитов) на исследуемые

бактерии. Так католиты, полученные при активации в течение 20 и 40 минут, приготовленные на осмотической воде, как и католиты, полученные при активации в течение 5-40 мин на водопроводной воде, подавляли рост бактерий во все сроки экспозиции к НАВ. В тоже время анолит, приготовленный на водопроводной воде, стимулировал рост *E.Coli* при экспозиции 2 и 24 часа.

При экспозиции *B.Cereus* анолит, приготовленный на осмотической воде, при 15 минутной экспозиции оказывал стимулирующее действие на жизнеспособность бактерий, а анолит на водопроводной воде уже при 5 минутной экспозиции вызывал бактериостатический эффект. В то же время, католит на осмотической воде, полученный при 40 минутной активации, при 45 экспозиции бактерий стимулировал рост *B.Cereus*, а католит, полученный при 40 минутной активации водопроводной воды, угнетал рост *B.Cereus* даже при нахождении в нем бактерий в течение 5 мин.

Таким образом, в результате проведенных исследований не было обнаружено ни ярко выраженного бактериостатического действия анолитов НАВ и стимулирующего влияния католитов НАВ. Наоборот, все исследуемые НАВ в той или иной степени – и в зависимости от условий активации - обладали как бактериостатическим, так и стимулирующим эффектом как на условно-патогенный штамм *E.Coli*, так и на штамм *B.cereus* IP 5832, используемый для лечения и профилактики серьезных заболеваний у человека. Полученные результаты служат обоснованием для проведения дальнейших исследований безопасности НАВ и указывают на невозможность бесконтрольного употребления НАВ человеком.

ГЛАВА 7. СИСТЕМА ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ АКТИВИРОВАННЫХ ПИТЬЕВЫХ ВОД И ТЕХНОЛОГИЙ ИХ ПРИГОТОВЛЕНИЯ

Результаты проведенных экспериментов показали, что тест на индукцию хромосомных aberrаций 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 оценки генотоксических эффектов НАВ.

Полученные данные позволили создать минимальную батарею для оценки потенциальной генотоксичности любых энергоинформационных вод, которую также можно использовать и для гигиенической оценки безопасности оборудования для приготовления активированных вод. Алгоритм этого подхода показан на рис. 7.1.

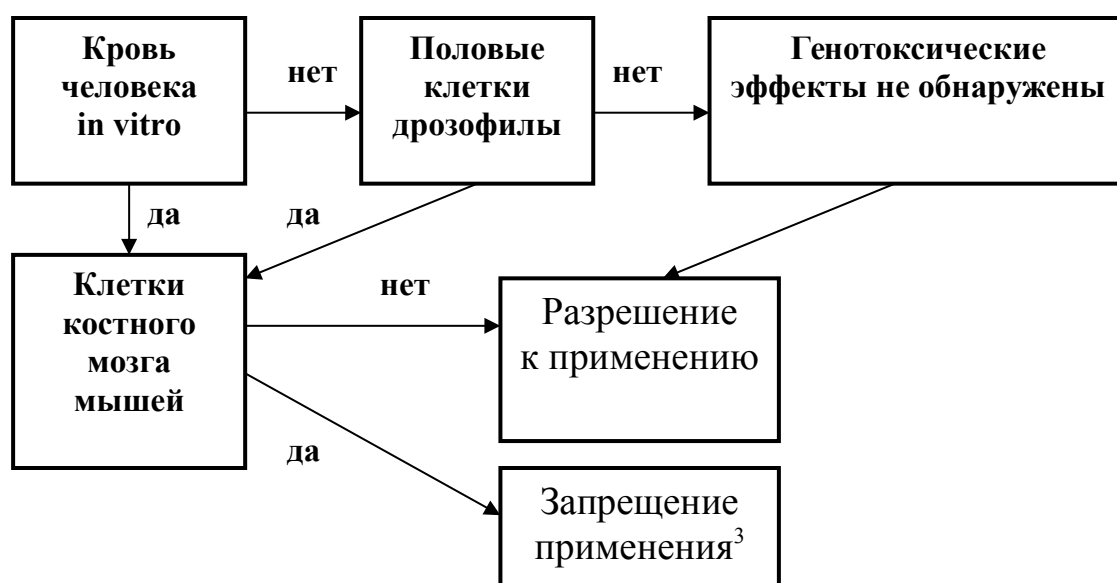


Рисунок 7.1. Алгоритм анализа генетической безопасности НАВ и технологий для их получения (блок-схема)

³ Решение по запрещению применения воды или технологии ее получения принимается учетом всей совокупности результатов токсикологических исследований

Для постановки краткосрочных экспериментов по оценке влияния НАВ на генетические структуры живых объектов *in vitro* и *in vivo* мы разработали методические рекомендации (приложение В), которые отличаются от действующих в РФ и странах ОЭСР документов по оценке генетической безопасности лекарственных препаратов, химических соединений, продуктов питания, радиационного излучения и пр. не только набором методов, но и перечнем рекомендуемых тест-объектов.

ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ. СВЯЗЬ ЭФФЕКТОВ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА С ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ НЕКОНТАКТНО АКТИВИРОВАННЫХ ВОД

Приступая к обобщению полученных данных, следует понимать, что в результате экспозиции в емкостях, содержащих контактно активированные анолит и католит, активируемая вода переходит в метастабильное состояние, которое характеризуется изменяющимися во времени аномальными физико-химическими свойствами. В процессе активации изменяется ее энергетическое состояние и доля связанной фазы (структура). Такое состояние воды является нестабильным, т.е. активированная вода постепенно релаксирует, восстанавливая свои исходные свойства и характеристики. При этом происходит передача энергии (заряда) на объекты, контактирующие с активированной водой (в нашем случае – это клетки живых организмов).

Как показали результаты экспериментов, адаптация клеток *in vitro* как и организмов эукариот к действию всех исследованных НАВ сопровождалась индукцией эффектов нестабильности генома. Поэтому мы проанализировали влияние свойств НАВ на проявление генотоксических эффектов и эффектов нестабильности генома на разных тест-объектах.

Анализ зависимости генотоксических эффектов НАВ от степени минерализации воды, использованной для активации (рис. 8.1), выявил существенное влияние этого показателя на скорость пролиферации клеток в культуре, причем только для католитов, полученных 20- и 40 мин. активацией (ОВП = - 61,7 ..206 мВ) и анолитов (ОВП = 224,4...360,8 мВ), в то время как для неактивированных вод (контроль) и вод, активированных в течение 5 мин, подобной связи выявлено не было. Как видно на рисунке 8.1, вода с максимальной минерализацией (московская водопроводная) менее всего тормозила пролиферативную активность клеток в культуре. Анализ корреляций между степенью минерализации исходной (неактивированной) воды

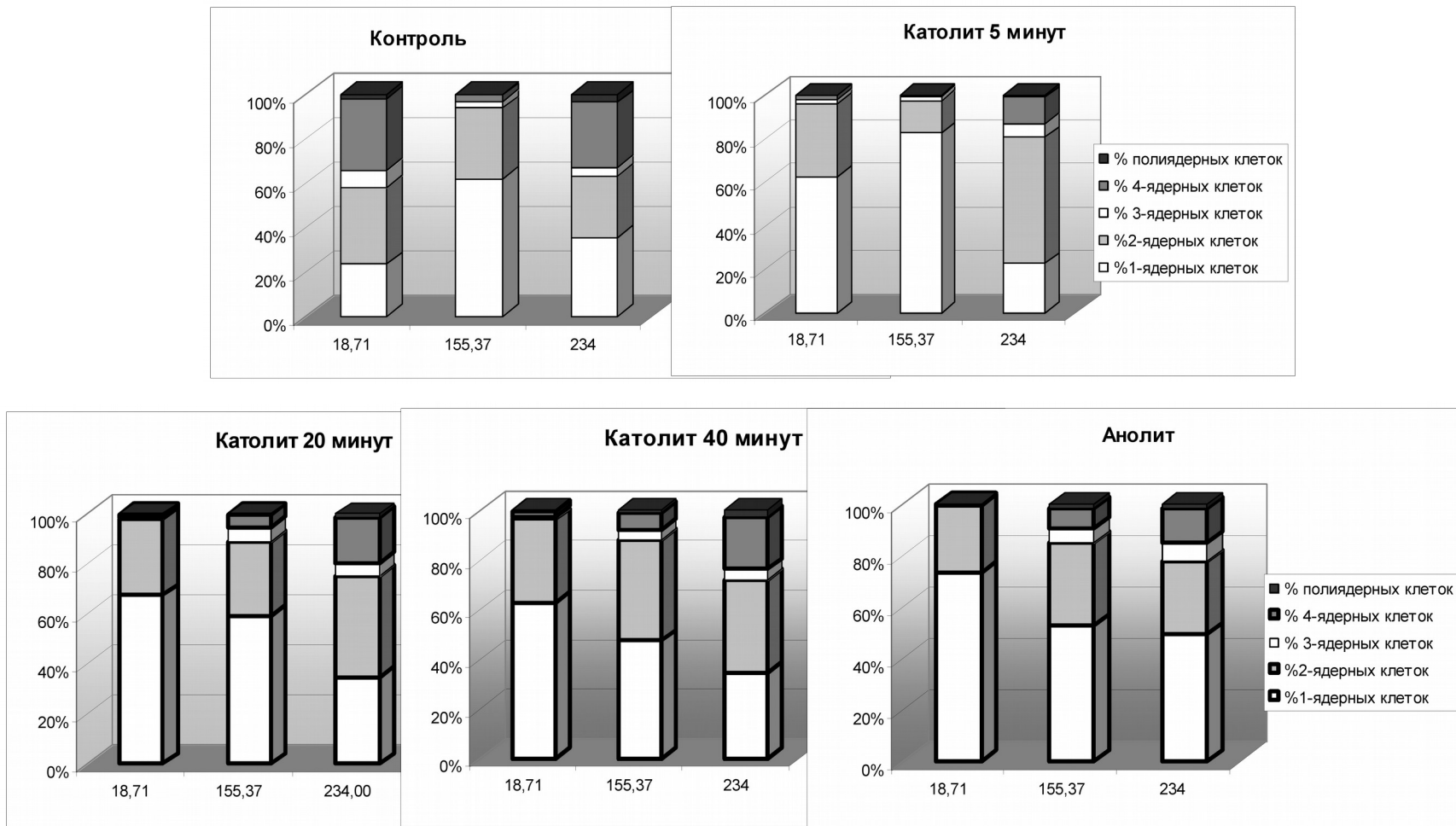


Рисунок 8.1. Изменение спектра клеточных популяций лимфоцитов крови человека, культивированных в реконструированных средах на основе НАВ, в зависимости от степени минерализации исходной (неактивированной) воды. По оси абсцисс – минерализация (мг/л), по оси ординат – доля каждой фракции клеток в спектре клеточных популяций

и показателями частоты генетических повреждений лимфоцитов крови человека, культивированных в реконструированных средах, обнаружил значимые связи ($p \leq 0,05$, 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 корреляционные связи выявлены не были, что обусловлено, вероятнее всего, небольшим количеством различных анолитов, изученных в данной работе. То есть, состав исходной (неактивированной) воды и условия активации играют существенную роль в приобретении ею генотоксической активности.

До сих пор было принято считать, что основным параметром воды, отражающим ее структуру и биологическую активность, является ОВП [4]. Поэтому на следующем этапе работы мы проанализировали связь основных генотоксических эффектов с этим показателем. Так как данных, полученных на культуре клеток крови человека, было больше всего, для начала использовали именно их (рис. 8.2). На этом рисунке хорошо видно, что частота делящихся клеток с повреждениями связана с митотическим индексом культур клеток крови человека (коэффициент корреляции Спирмена = 0,59; $p \leq 0,05$), что естественно – повреждение в этом тесте, можно увидеть только после деления клетки, также как в тесте на индукцию хромосомных aberrации – только на метафазной пластинке. Но также очевидно отсутствие зависимости этих показателей от ОВП.

Поскольку наши эксперименты выявили качественные различия во взаимосвязи между эффектами пролиферации и частотами поврежденных клеток в средах на католитах и анолитах, мы проследили указанные взаимосвязи отдельно для неактивированных вод и каждого типа НАВ (рис. 8.3).

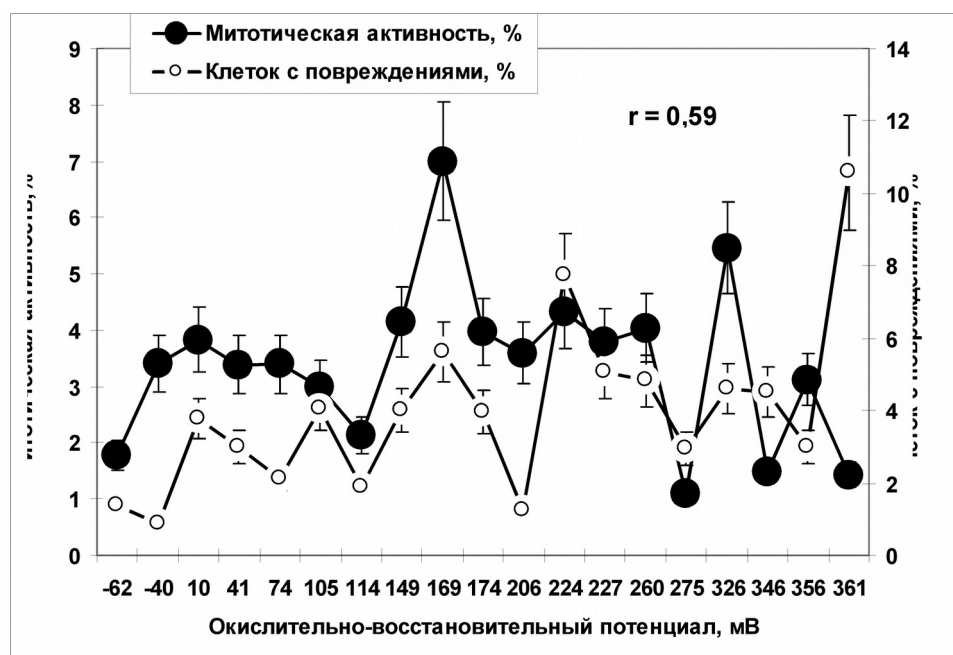


Рисунок 8.2. Изменение митотического индекса и частоты делящихся клеток с повреждениями в зависимости от ОВП всех изученных НАВ в реконструированных средах, использованных для культивирования клеток венозной крови человека

Как видно, раздельный анализ только в одном случае выявил значимую связь с ОВП - это изменение митотической активности анолитов ($r = -0,71$).

Митотическая активность – не единственный показатель, характеризующий процесс деления клеток в культуре. Не менее, а, может быть, даже более важным является объем пролиферативного пула, включающий в себя и количество клеток, разделившихся в культуре на момент фиксации, и частоту клеток в стадии митоза. На рис. 8.4 показаны результаты анализа связи между объемом пролиферативного пула в культурах клеток на реконструированных средах с ОВП НАВ.

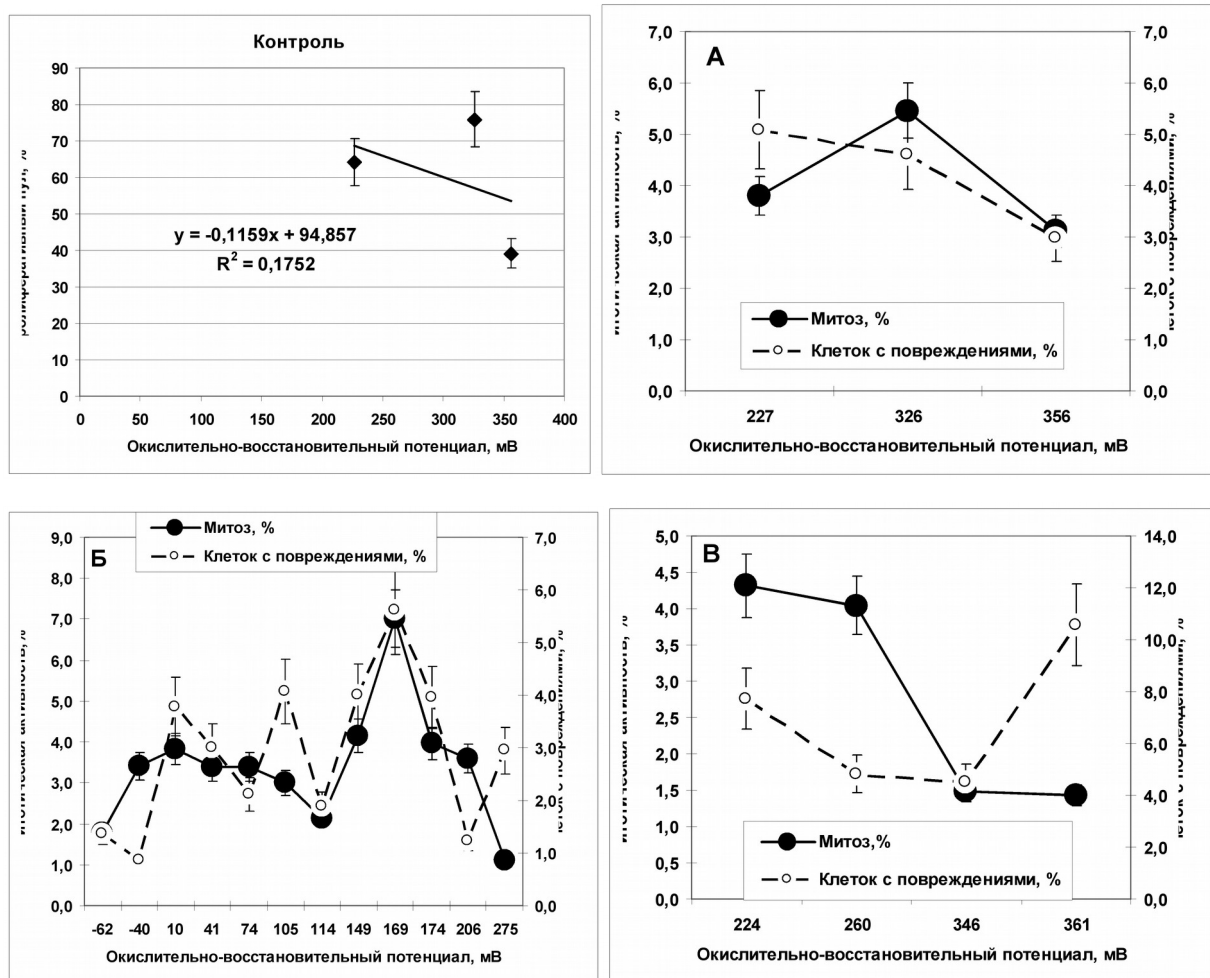


Рисунок 8.3. Раздельный (в зависимости от типа НАВ) анализ изменения митотического индекса и частоты делящихся клеток с повреждениями в зависимости от ОВП всех изученных НАВ в реконструированных средах, использованных для культивирования клеток венозной крови человека:

А – контроль, Б - католиты, В - анолиты

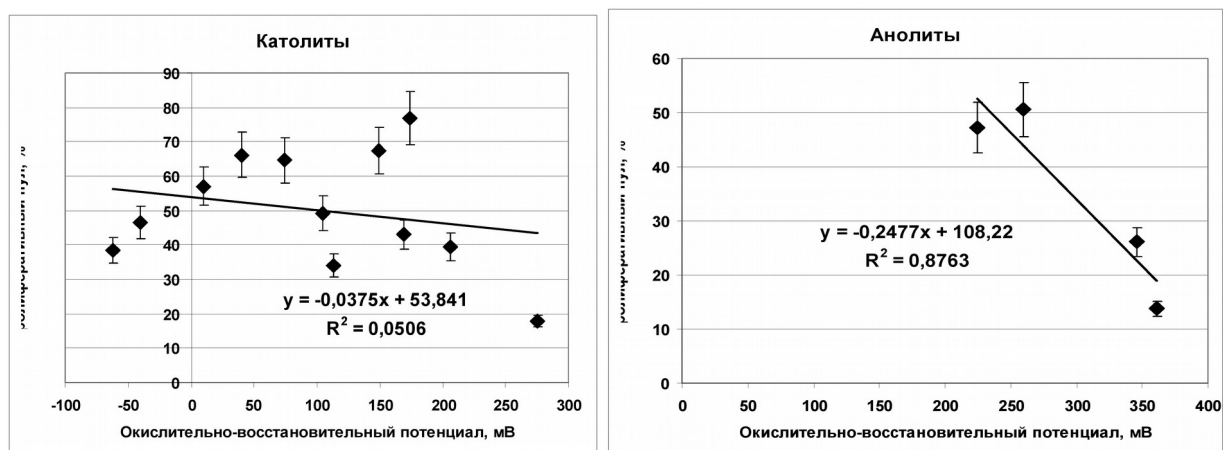


Рисунок 8.4. Раздельный (в зависимости от типа НАВ) анализ изменения пролиферативного пула в культурах клеток крови человека в зависимости от ОВП реконструированных сред.

Как видно на этом рисунке, влияние ОВП на пролиферативную активность клеток, также как при анализе митотической активности, прослеживалось только для анолитов.

Затем мы провели корреляционный анализ между всеми цитогенетическими показателями, определяемыми в микроядерном тесте на культуре клеток крови человека, и всеми изученными физико-химическими показателями НАВ, на которых были приготовлены реконструированные среды, для всех вод⁸, а также отдельно для католитов и анолитов (табл. 8.1 - 8.4).

Корреляционный анализ, проведенный в единой матрице для всех изученных вод, не выявил какой-либо логики во взаимосвязи физико-химических параметров изученных НАВ и показателей нестабильности генома в культуре лимфоцитов крови человека. В то же время, корреляционный анализ, проведенный по тому же критерию, но отдельно для католитов (табл. 8.1 и 8.2) и анолитов (табл. 8.3 и 8.4) показал, что практически все эффекты нестабильности генома в анолитах были ассоциированы с ОВП и с рН воды, а в **католитах** – со светосуммой люминол-геминовой хемилюминесценции. Обнаружение этих связей означает не только то, что анолиты и католиты угнетали (отрицательная корреляция) пролиферативную активность клеток, но демонстрирует механизм этого феномена: **для анолитов – через изменение ОВП и рН НАВ, а для католитов – путем активации свободнорадикальных реакций.**

Кроме отмеченных эффектов, для **анолитов** была выявлена связь ОВП и рН с частотами ускоренно делящихся клеток, несущих генетические повреждения и клеток в состоянии апоптоза. Для **католитов** подобные связи с ОВП и рН выявлены не были, что может говорить об отсутствии этих влияний в механизмах индукции эффектов нестабильности генома в присутствии католитов. То есть, в механизмах возникновения эффектов нестабильности

⁸ В табл. 8.1- 8.6 представлены только те цитогенетические показатели, по которым была обнаружена хотя бы одна значимая корреляционная связь с указанными физико-химическими свойствами НАВ.

Таблица 8.1. Корреляции между показателями пролиферации культивированных клеток крови человека в реконструированных средах на **католитах**, приготовленных на основе осмотической, московской водопроводной и бутилированной воды «Пилигрим» (коэффициенты корреляции Спирмена)

Показатель	Спектр делящихся клеток (%)						Пролиферативный пул	Асимметрия 2-го митоза	Индекс репликации	Индекс пролиферации
	1-ядерные	2-ядерные	3-ядерные	4-ядерные	Поли-ядерные	Ускоренно-делящиеся				
Светосумма хемилюминесценции*10 ⁴ , усл.ед.	-0,76	0,67	0,62	0,75	0,53	0,73	0,77	-0,31	0,71	0,75
ОВП, мВ	0,07	-0,31	0,18	-0,29	-0,29	-0,18	-0,12	0,69	-0,31	-0,29
pH, усл.ед.	-0,02	-0,16	0,05	-0,23	0,00	-0,18	-0,12	0,38	-0,26	-0,20

Примечание: значимые корреляции ($p \leq 0,05$) выделены шрифтом

Таблица 8.2. Корреляции между показателями генетических повреждений в культивированных клетках крови человека в реконструированных средах на **католитах**, приготовленных на основе осмотической, московской водопроводной и бутилированной воды «Пилигрим» (коэффициенты корреляции Спирмена)

Показатель	Клетки с повреждениями (%)					
	1-ядерные	2-ядерные	4-ядерные	Делящиеся клетки с МЯ	Делящиеся клетки с НПМ	Ускоренно делящиеся
Светосумма хемилюминесценции*10 ⁴ , усл.ед.	-0,50	-0,35	0,86	-0,13	0,62	-0,31
ОВП, мВ	0,40	0,42	-0,06	0,39	0,16	-0,13
pH, усл.ед.	0,26	0,42	-0,10	0,32	-0,06	-0,36

Примечание: значимые корреляции ($p \leq 0,05$) выделены шрифтом

Таблица 8.3 Корреляции между показателями пролиферации культивированных клеток крови человека в реконструированных средах на **анолитах**, приготовленных на основе осмотической, московской водопроводной и бутилированной воды «Пилигрим» (коэффициенты корреляции Спирмена)

Показатель	Частота апоптоза	Спектр делящихся клеток (%)					Асимметрия 2-го митоза	Индекс репликации	Индекс пролиферации
		4-ядерные	Поли-ядерные	Делящиеся	Пролиферативный пул	Ускоренно делящиеся			
Светосумма хемилюминесценции*10 ⁴ , усл.ед.	-0,40	0,40	0,32	0,40	0,40	0,40	-0,32	0,40	0,40
ОВП, мВ	0,80	-0,80	-0,77	-0,80	-0,80	-0,80	-0,95	-0,80	-0,80
pH, усл.ед.	-0,80	0,80	0,77	0,80	0,80	0,80	0,95	0,80	0,80

Примечание: значимые корреляции ($p \leq 0,05$) выделены шрифтом

Таблица 8.4. Корреляции между показателями генетических повреждений в культивированных клетках крови человека в реконструированных средах на **анолитах**, приготовленных на основе осмотической, московской водопроводной и бутилированной воды «Пилигрим» (коэффициенты корреляции Спирмена)

Показатель	Делящиеся клетки с повреждениями					
	2-ядерные с НПМ	2-ядерные с МЯ	4-ядерные с МЯ+НПМ	Поли-ядерные с НПМ	Делящиеся с МЯ	Ускоренно делящиеся с МЯ+НПМ
Светосумма хемилюминесценции*10 ⁴ , усл.ед.	-0,40	-0,80	-0,32	-0,32	-0,20	-0,32
ОВП, мВ	0,80	-0,40	-0,95	-0,95	-0,98	-0,95

pH, усл.ед.	-0,80	0,40	0,95	0,95	0,98	0,95
-------------	--------------	------	-------------	-------------	-------------	-------------

Примечание: значимые корреляции ($p \leq 0,05$) выделены шрифтом

генома, индуцированных католитами и анолитами на культуре клеток, играют роль разные физико-химические свойства НАВ. Понятно, что коэффициенты корреляции могут изменяться с увеличением числа НАВ в матрицах корреляции, но основной принцип – связь эффектов католитов с активностью свободнорадикальных реакций НАВ, а анолитов с ОВП и pH воды измениться не должен (это подтверждают результаты численного моделирования в рамках статистического анализа).

Аналогичный анализ мы провели по результатам подострого эксперимента на мышах. И в этом случае для ОВП статистически значимые связи с цитогенетическими эффектами выявлены не были. Можно предположить, что при значительном увеличении количества НАВ, изучаемых в одном эксперименте, удастся выявить эти взаимосвязи за счет увеличения объема выборки, однако это столь значительно увеличивает объем экспериментального материала, что проанализировать его в разумные сроки не представляется возможным.

Принимая во внимание тот факт, что частота аберрантных клеток не коррелировала с содержанием СХЛ, а связь с ОВП у католитов была существенно нелинейной, можно предположить наличие в активированных водах, причем, преимущественно, в католитах (для заключения по анолитам недостаточно данных) генотоксических факторов, которые не учитывались в данной работе.

Отсутствие связи с ОВП НАВ мы обнаружили и в экспериментах по оценке жизнеспособности бактерий (рис. 8.5 и 8.6)

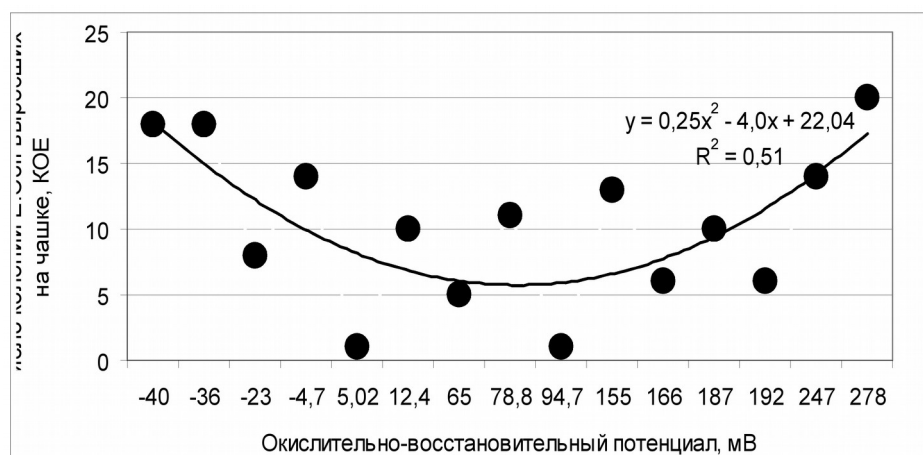


Рисунок 8.5. Жизнеспособность *E.coli* 1257 при 2-часовой инкубации бактерий в НАВ на водопроводной воде (посев 10^3 кл/ мл)

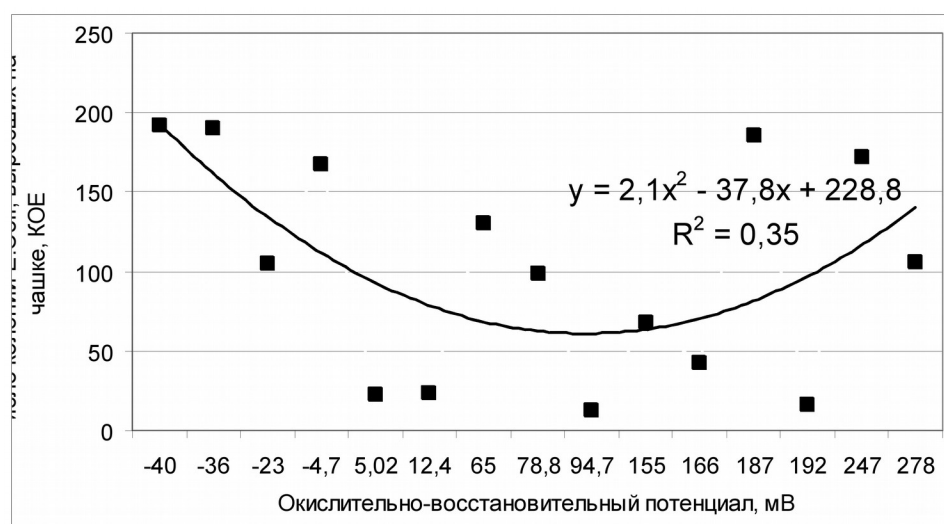


Рисунок 8.6. Жизнеспособность *E.coli* 1257 при 2-часовой инкубации бактерий в НАВ на водопроводной воде (посев 10^4 кл/ мл)

Интересно, что в экспериментах на половых клетках самцов дрозофилы мы обнаружили высокоуровневую ассоциативную связь между значениями ОВП вод, которыми были экспонированы самцы мух, и частотами РЭЛ в половых клетках самцов, ее потреблявших ($r=0,90$; $p=0,006$, рис. 8.7.).

Важно отметить, что с уменьшением ОВП воды частоты РЭЛ снижались, причем самые высокие частоты РЭЛ были отмечены в контроле. Поскольку связи между ОВП изученных НАВ и количеством отложенных яиц выявлено не было ($r = 0,1$; $p = 0,82$), снижение частоты РЭЛ со снижением ОВП воды может говорить не об уменьшении гибели эмбрионов, а о гибели сперматозоидов,

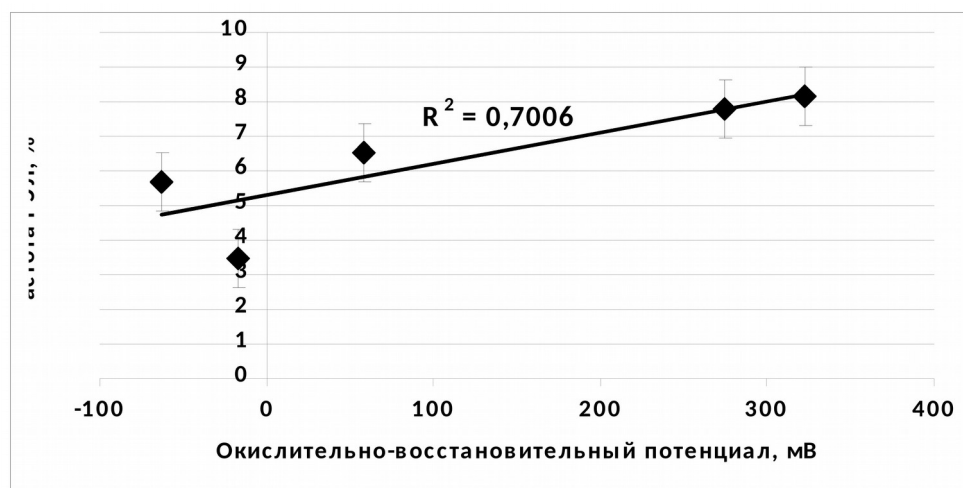


Рисунок 8.7. Изменение частоты РЭЛ в половых клетках самцов дрозофилы в зависимости от ОВП НАВ на основе московской водопроводной воды, которую они потребляли.

несущих мутации или другие повреждения (аналогично тому, как изменение частоты апоптоза свидетельствует о гибели клеток, несущих генетические повреждения, ср. с результатами гл.4). Связи между ОВП НАВ и частотами ПЭЛ выявлено не было ($r = 0,090$; $p > 0,05$).

В эксперименте на дрозофиле была выявлена связь частоты РЭЛ с электропроводностью НАВ (рис. 8.8), воспроизводящая картину связи частоты РЭЛ с ОВП.

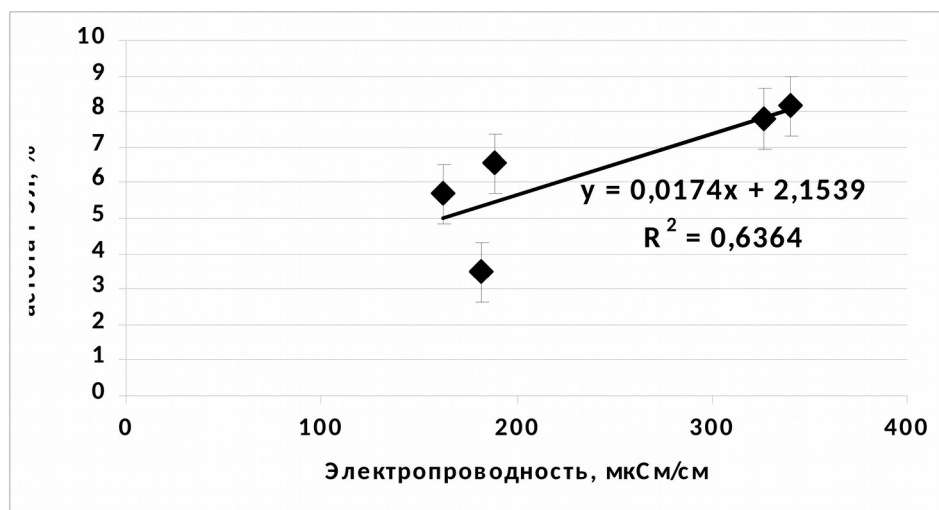


Рисунок 8.8. Изменение частоты РЭЛ в половых клетках самцов дрозофилы в зависимости от электропроводности НАВ на основе московской водопроводной воды, которую они потребляли

Как видно, закономерности, выявленные в опыте на половых клетках дрозофилы, качественно отличаются от тех, которые были обнаружены в экспериментах, определяющих цитогенетические эффекты. Суть этих различий заключается в специфике теста на индукцию доминантных летальных мутаций, который не позволяет идентифицировать и учесть только генетическую причину эффекта (как тесты, основанные на цитогенетическом анализе), но выявляет всю сложную комбинацию генотоксических и токсических эффектов изучаемого фактора. Поэтому мы обнаружили связь ОВП и электропроводности НАВ с частотами РЭЛ, характеризующими комплекс эффектов, но не с частотами ПЭЛ, определяющими истинные мутационные события.

Следует также отметить, что поскольку была выявлена связь между значениями ОВП НАВ, которыми были экспонированы самцы мух, и частотами РЭЛ в половых клетках самцов, ее употреблявших, в то время как подобная связь для ПЭЛ обнаружена не была, можно предположить влияние других свойств НАВ или иных факторов, неучтенных в данной работе, на возникновение ПЭЛ.

На следующем этапе анализа влияния физико-химических свойств на индукцию генотоксических эффектов НАВ мы изучали влияние степени структурированности НАВ, принимая во внимание, что все изученные в данной работе физико-химические показатели могли быть связаны между собой. Чтобы в этом разобраться мы провели корреляционный анализ, в котором исследовали связь показателей ОВП, рН и СХЛ со степенью структурированности НАВ (табл. 8.5).

Как видно в этой таблице, в реконструированных средах **на католитах** значения ОВП не коррелировали с долей структурированной фазы в НАВ, причем СХЛ была ассоциирована только с одним диапазоном в энергетическом распределении структурированной фазы воды (0,301-0,4), а значения рН – с другим, но близким диапазоном этого распределения 0,1 – 0,3. В средах **на анолитах** мы наблюдали иной характер связей, хотя они были реализованы в том же диапазоне энергетического распределения НАВ.

Таблица 8.5. Связь между различными физико-химическими показателями и степенью структурированности НАВ
(раздельно для католитов и анолитов, приготовленных на всех изученных водах; критерий Спирмена)

	Католиты			Анолиты		
	светосумма хемилю- минисценции *10 ⁴ , усл.ед.	ОВП, мВ	рН, усл.ед.	светосумма хемилю- минисценции *10 ⁴ , усл.ед.	ОВП, мВ	рН, усл.ед.
Распределение структурированной фазы в воде, %						
0,00 - 0,1	- 0,05	- 0,04	- 0,13	0,40	0,80	- 0,80
0,101-0,2	0,61	- 0,29	- 0,78	0,95	0,32	- 0,32
0,201-0,3	0,01	0,10	0,76	0,80	0,40	- 0,40
0,301-0,4	- 0,70	0,17	0,56	- 0,32	- 0,95	0,95
0,401-0,5	- 0,57	0,53	0,57	- 0,77	- 0,77	0,77
0,501-0,6	- 0,58	0,49	0,56	- 0,77	- 0,77	0,77
0,601-0,7						
0,701-0,8				- 0,77	- 0,77	0,77
0,801-0,9						
0,901-1,0	- 0,41	0,52	0,41			
более 1,0						

Примечание: шрифтом выделены коэффициенты значимых корреляций ($p \leq 0,05$)

Табл. 8.5. оставляет много вопросов, в частности, почему для католитов в самом начале энергетического распределения структурированной фазы НАВ коэффициент корреляции с рН - отрицательный, а уже в следующем диапазоне – положительный. Однако анализ приведенных данных позволяет сделать и некоторые перспективные заключения:

- связь между показателями структурированности воды и другими физико-химическими свойствами действительно существует, что подтверждает изменение параметров структурированности при изменении других физико-химических показателей, в частности при неконтактной (электрохимической) активации;

- католиты и анолиты имеют кроме ранее установленных различий во взаимосвязи между цитогенетическими параметрами (рис. 3.7, 4.8), еще и по

характеру взаимосвязи между физико-химическими свойствами НАВ и параметрами структурированности.

Следующий этап анализа влияния физико-химических свойств на генотоксические эффекты НАВ посвящен изучению связей с активностью свободнорадикальных реакций. Здесь, прежде всего, следует отметить, что неконтактная активация минеральной воды «Пилигрим», имевшей минимальный из всех вод, изученных в данной работе, уровень люминол-геминовой хемилюминесценции, вопреки ожиданию, привела к индукции максимального из всех обнаруженных уровней нестабильности генома лимфоцитов крови человека. Это означает, что для нормального функционирования живого организма необходимо присутствие некоторого количества свободных радикалов (или их индукторов).

А.А.Стехин предполагает, что основной вклад в люминол-геминовую хемилюминесценцию НАВ вносит содержание перекиси водорода, с которой могут быть связаны все генотоксические эффекты НАВ [100]. С этим можно было бы согласиться, поскольку хорошо известно, что перекись водорода обладает мутагенной активностью [71, 130, 136, 150]. Однако также известно, что перекись водорода всегда присутствует в межклеточном пространстве (в норме у млекопитающих до 10 нМ), в легких млекопитающих она нарабатывается со скоростью до 50 нМ/мин на 1 г ткани [167]. Открытие функции перекиси водорода как сигнальной молекулы [13, 167] и недавнее обнаружение у нее свойств фактора транскрипции [157], а также собственные данные, свидетельствующие о максимальных генотоксических эффектах в реконструированных средах именно на НАВ, приготовленных на основе минеральной воды «Пилигрим» с минимальной активностью свободнорадикальных реакций (минимальной светосуммой хемилюминесценции), доказывает необходимость H_2O_2 для нормального функционирования живого. В частности, это означает, что перекись водорода не может быть как единственным, так и основным индуктором генетической нестабильности НАВ.

Бесспорно, что для детального понимания механизма индукции генотоксических эффектов в живой клетке под действием НАВ необходимы специальные исследования, проведение которых не входит в задачи данной работы. Однако можно высказать некоторые соображения. Так, анализ литературы показал, что современные представления о транспорте воды в клетку включают два основных механизма, один из которых основан на диффузном проникновении отдельных молекул воды через мембрану клетки за счет разницы в осмотическом давлении. Согласно второму механизму вода проникает в клетку через селективные каналы, «организованные» семейством белков аквапоринов, энергия активации которых в 2-3 раза меньше, чем для диффузного транспорта воды [112, 125, 149,]. То есть, транспорт воды через канал, по крайней мере, в 2 раза более энергетически выгоден, чем диффузный осмос. У человека аквапорины (сейчас известно 11 видов) были найдены в разных тканях, включая эритроциты крови, клетки почек, мозга, и др.; диаметр пор составляет 3 Å, что лишь немного больше диаметра молекулы воды (самая узкая часть поры имеет диаметр 2,8 Å и может пропустить только одну молекулу воды). Аквапорины пропускают в клетку **только отдельные молекулы воды**, препятствуя прохождению даже ионов гидроксония. Важно, что при прохождении по каналам имеющиеся в воде водородные связи разрываются, и в клетки попадают только **отдельные молекулы воды**. Поэтому можно предположить, что увеличение доли структурированной (связанной) фазы воды в процессе активации, сопровождающееся делокализацией электронов на супрамолекулах воды, что предполагается при неконтактной электрохимической активации воды [100], может негативно отражаться на стабильности генома и жизнеспособности клеток. В табл. 8.6. обобщены результаты корреляционного анализа показателей нестабильности генома лимфоцитов крови человека, культивированных в реконструированных средах с использованием всех изученных НАВ. Как видно, для **анолитов** было характерно торможение пролиферации, причем этот феномен наблюдался в водах с малой долей (0,0 ÷ 0,1%) связанной фазы. В то же время, эффекты,

индуцированные **католитами**, проявлялись при большей степени структурированности ($0,3 \div 0,6\%$) и характеризовались повышением частоты клеток с повреждениями, клеток с асимметричным распределением генетического материала и частоты апоптоза. Эти данные позволяют заключить, что степень структурированности воды может быть новым фактором генетического риска для электрохимически активированных вод. Обобщая данные, представленные в этом разделе работы, следует предположить, что при неконтактной (электрохимической) активации воды может реализовываться не один, а несколько механизмов индукции генетической нестабильности:

А) под действием активных радикалов (существующих или образующихся в католитах в присутствии электронов), которые повреждают мембраны клеток по механизму индукции перекисного окисления липидов;

Б) под действием электронов, делокализованных на супрамолекулах НАВ, при взаимодействии которых с клеточной мембраной может происходить локальное ее повреждение (вероятнее всего, также по механизму индукции перекисного окисления) и дальнейшее разрушение фрагментов клеточных мембран;

В) под действием генотоксичных соединений, образующихся и попадающих в НАВ в процессе ее неконтактной активации в пластиковой таре (например, при выходе небольшого количества мономера и/или пластификатора в воду, в которой присутствуют электроны, ионы, радикалы и ион-радикалы, образовавшиеся в процессе неконтактной активации). Химический анализ, проведенный для 13 образцов московской водопроводной воды и НАВ на ее основе, только в 2 случаях показал увеличение концентрации веществ по сравнению с исходными водами: в католите, полученном при максимальной .

Таблица 8.6. Связь интегральных показателей нестабильности генома в клетках крови человека со степенью структурированности вод, использованных для приготовления реконструированных сред (католиты, анолиты и контроль анализировали отдельно, критерий Спирмена)

Энергетические уровни (диапазон распределения) структурированной фазы в воде, Δq , %	Частота митоза	Частота апоптоза	% 1-ядерных клеток в спектре клеточных популяций	% 1-ядерных клеток с МЯ	% 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		+		+	+	+				
Доля структурированной (связанной) фазы в воде (среднее значение), q , %		+	-						-	+

Примечание: в таблице показаны только значимые корреляции (r во всех случаях $> 0,5$ $p \leq 0,05$).

Обозначения:

-	обратная корреляция			
+	прямая корреляция			
	Анолит		Католит	Контроль

продолжительности экспозиции, и в анолите были обнаружены 3 неидентифицированных фталата. Отсутствие нормативов не позволяет оценить меру опасности присутствия этих соединений в воде. Однако можно предположить, что сами фталаты, как и продукты их трансформации в НАВ, концентрации которых ниже предела отпределения прибора и поэтому не определяются, могут, тем не менее, оказывать влияние на состояние генетического аппарата живых организмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Новые технологии водоподготовки путем изменения физико-химических свойства питьевой воды, получившие в настоящее время широкое распространение в РФ и за рубежом, требуют дополнительных исследований безопасности таких вод. Это требование обосновано, в частности, тем, что в процессе электрохимической активации, в том числе, неконтактной (технологии, признанной наиболее безопасной среди всех основанных на электрохимических реакциях), питьевая вода приобретает новые свойства - измененный окислительно-восстановительный потенциал, в воде изменяется доля связанной (структурированной) фазы и пр., что влияет на процессы формирования, стабилизации и функционирования клеточных мембран, белков и ДНК.

Поэтому мы предположили, что неконтактно (электрохимически) активированные воды могут обладать генотоксической активностью.

Верификация этой гипотезы стала целью данной работы.

В результате проведенных исследований были получены следующие результаты:

- анализ выживаемости бактерий, экспонированных к различным неконтактно активированным водам, выявил два основных феномена: нестабильность эффектов от ОВП и бактерицидное действие, которое проявляется вне зависимости от того музейный ли это штамм *E.coli* 1257 (условно патогенный) или аптечный штамм *B.cereus*;

- на живых моделях разного уровня – культуре клеток крови человека, мышцах *in vivo* и половых клетках самцов дрозофилы было показано, что активированные воды – католиты и анолиты, полученные при разных условиях активации, оказывали влияние на скорость пролиферации и/или митотическую активность клеток и частоту генетических повреждений в них; адаптация животных к неконтактно активированным водам сопровождалась индукцией генетических повреждений в клетках костного мозга, причем в большинстве групп животных, потреблявших католиты, эти процессы сопровождались повышением митотической активности; поскольку генотоксические эффекты НАВ в эксперименте на мышях были обнаружены только через сутки и 8 суток после начала выпаивания, а не в более поздние сроки, продолжительность экспериментов по изучению генотоксического действия НАВ на мышях *in vivo* следует сократить до 5-8 суток, что согласуется с рекомендациями, принятыми в РФ и странах ОЭСР для химических соединений и лекарственных репаратов.

- генотоксические эффекты неконтактно активированных вод были связаны с составом (минерализацией) самих вод и с условиями получения контактно активированных вод, затем использованных для получения НАВ;

- под действием дополнительной мутагенной нагрузки (3 мг/мл стандартного мутагена МННГ) во всех культурах лимфоцитов крови человека приготовленных как на осмотической, так и на водопроводной воде, неконтактно активированной в различных условиях, наблюдались сходные изменения: торможение, а при использовании большей силы тока (при получении контактно активированных вод) – стимуляция пролиферации, повышение степени асимметрии деления генетического материала во втором митотическом цикле и повышение частоты апоптоза; в культурах на анолитах, экспонированных к 6 мкг/мл МННГ, частота двуядерных клеток с повреждениями, как правило, снижались иногда ниже уровня контроля, что было связано не только с повышением частоты апоптоза, но с наблюдавшимся значительным торможением пролиферативной активности. Использование двух концентраций стандартного мутагена показало, что порогом адаптации в условиях данного эксперимента являлся ответ генома на действие 3

мкг/мл МННГ, поскольку в присутствии максимальной концентрации МННГ были выявлены инвертированные эффекты, связанные с гибелью клеток. Это означает, что само пребывание клеток в стандартных средах, приготовленных на неконтактно активированных водах, является фактором, активизирующим систему клеточной адаптации, то есть, потенциально небезопасным.

- как без, так и в присутствии МННГ *in vitro*, а также в экспериментах на мышцах *in vivo* католиты и анолиты, олученные активацией одной и той же воды, различались качественно по соотношению основных цитогенетических эффектов – пролиферации и повреждения: действие анолитов соответствовало описанному в литературе для мутагенов, а католитов – для канцерогенов; генотоксические эффекты католитов были ассоциированы со светосуммой люминол-геминовой хемилюминесценцией активированной воды, а анолитов – с ее рН и окислительно-восстановительным потенциалом; последнее свидетельствует о реализации генотоксических эффектов католитов и анолитов с преимущественным вкладом разных механизмов.

- цитогенетические эффекты одной и той же воды, изученные на разных живых объектах, дали качественно близкие результаты, что доказывает адекватность использования культуры клеток крови человека для прогноза генотоксических эффектов в экспериментах на животных.

Обобщая полученные данные, следует отметить, что уже только одно обнаружение неселективного бактерицидного действия неконтактно активированных вод не позволяет бесконтрольно использовать их населением. В этом контексте выявление множественных генотоксических эффектов НАВ только усиливает исходно неблагоприятный вывод о том, что эти воды потенциально опасны, причем эта опасность – мутагенная и канцерогенная.

Следует отметить, что обнаруженные эффекты качественно согласуются с теми немногими данными по изучению биологических эффектов активированных вод, имеющиеся в доступной литературе. Так, в частности, было обнаружено бактерицидное действие НАВ (накожные пробы), хотя авторы сочли этот эффект позитивным. Описано – к сожалению, в разных публикациях – и

разнонаправленное действие НАВ на живые объекты в динамике изменения ОВП, связанное не только с характеристиками самих НАВ, но и с условиями экспозиции. В ситуации, когда систематическое изучение биологической активности не предпринималось вообще никогда, качественное совпадение собственных данных с литературой – большая удача, свидетельствующая о корректности проведенных исследований и надежности сделанных выводов.

И, наконец, хочется снова процитировать замечательную книгу С.И.Аксенова: «..представления о регуляторной роли воды в биологических системах находят непосредственное подтверждение при изучении особенностей воздействия воды на состояние и функциональные характеристики разнообразных биологических структур, начиная от молекул белков, биологических мембран и кончая клеточными и более высокими уровнями организации живых систем. Более того, именно на базе таких представлений появилась возможность для построения взаимосвязанной картины, позволяющей с единой точки зрения рассмотреть основные особенности структуры, а также физико-химические механизмы, обеспечивающие возможность функционирования и устойчивость живых систем, включая возможность их эволюции, т.е. главные характеристики, которые отличают жизнь от неживого вещества» [2].

И именно поэтому необходимо необыкновенно осторожно и внимательно относиться ко всем воздействиям, приводящим к изменению физико-химических свойств воды. Это особенно важно понимать при изготовлении активированных питьевых вод, потому что, как мы показали, их влияние на живую систему затрагивает самые глубинные механизмы продолжения и регуляции жизни.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Питьевые воды, полученные неконтактной электрохимической активацией, не могут быть рекомендованы населению без предварительной оценки отдаленных последствий их потребления в системе краткосрочных тестов.

2. При выдаче разрешительной документации на приборы для активации питьевых вод с целью обеспечения генетической безопасности населения следует оценивать потенциальные генотоксические эффекты вод, полученных на этих приборах.

3. Наиболее информативными тест-объектами для оценки генетической безопасности питьевых вод, полученных неконтактной электрохимической активацией, являются: 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. В качестве экспресс-метода рекомендуется микроядерный тест на клетках крови человека; культивированных в реконструированных средах на основе изучаемых активированных вод.

4. Для проведения углубленных исследований генетической безопасности активированных вод и приборов для их получения рекомендуется проводить исследования в 3 тестах: тесте на индукцию микроядер в клетках крови человека; культивированных в реконструированных средах на основе изучаемых активированных вод, тесте на индукцию доминантных летальных мутаций в половых клетках *Drosophila melanogaster* и тесте на индукцию хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей (при потреблении животными изучаемых вод *ad libitum* в течение 5-8 суток).

5. Тест на индукцию микроядер в лимфоцитах крови человека пригоден для качественного прогноза генотоксических эффектов у млекопитающих не только в остром, но и в разные периоды подострого эксперимента.

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 условия 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: как в католитах, так и в анолитах 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 в течение 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 сутки - 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).

Кроме того, генотоксичные соединения могут образовываться и/или попадать в НАВ в процессе ее неконтактной активации в пластиковой таре.

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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аджи Ю.А. Эффективность лечения хронического генерализованного пародонтита средней степени на основе применения электроактивированных водных растворов. Автореф. дисс. канд. мед. наук. - Воронеж, 2009. - 23 с.
2. Аксенов С.И. Вода и ее роль в регуляции биологических процессов. – М.: Ин-т компьют. исслед., 2004 . – 212 с.
3. Активатор «Ива-1». Интернет-магазин «Живая вода». URL: <http://med-aqua.com/iva-1.html> (дата обращения 15.10.2013).
4. Александрова Э.А., Гергаулова Р.М., Шрамко Г.М., Князева Т.В. Способ обработки озимой пшеницы: Патент на изобретение №2349071. Приоритет от 02.07.2007. Публикация 20.03.2009. Бюл.№8.
5. Александрова Э.А., Шрамко Г.А., Красавцев Б.Е. Влияние электрохимически активированной воды на растительные биосистемы // IV Межд. конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине». – Науч. тр. – СПб., 2012. URL: www.biophys.ru/archive/congress2012/proc-p128-d.pdf (дата обращения 25.05.2012).
6. Алексеева А.В. Гигиеническая оценка биологических эффектов йода в питьевой воде: автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Москва, 2002. – 23с.
7. Андреев В.С. Способ снижения окислительно-восстановительного потенциала воды: Патент № RU 2351546. Приоритет от 09.01.2007. Публикация 10.04.2009. Бюл. № 10.
8. Аникиев А.В. Способ активации жидкости: Патент РФ № 2333155. Приоритет от 06.10.2006. Публикация 10.09.2008. Бюл. №25.
9. Арефьев В.А., Лисовенко Л.А. Англо-русский толковый словарь генетических терминов / под ред. Л.И.Патрушев. - Москва: Изд-во ВНИРО, 1995. - 407с.

10. Аристова Н.А., Пискарев И.М., Ушканов В.А. Физические методы получения экологически чистой активированной воды: препринт НИИЯФ МГУ №12/856. - М., 2009. – 86с.
11. Бахир В.М., Задорожний Ю.Г, Леонов Б.И., Паничева С.А., Прилуцкий В.И. Электрохимическая активация: очистка воды и получение полезных растворов. – М.: ВНИИИМТ, 2001. - 176 с.
12. Белицкий Г.А., Хованова, Е.М., Шарупич, П.И. Предсказание канцерогенных свойств химических соединений по их мутагенной активности // Ускоренное определение канцерогенности химических соединений: Сб. науч. трудов. - М., 1981. - С.93-96.
13. Белоусов В.В., Ениколопов Г.Н., Мишина, Н.М. Компартиментализация передачи сигналов, опосредованных активными формами кислорода // Биоорг. химия. - 2013, № 39 (4). – С. 383-399.
14. Беляева Н.Н, Рахманин Ю.А., Михайлова Р.И., Шамарин А.А., Кирьянова Л.Ф., Сковронский А.А., Даабуль С.А. Структурно-функциональные показатели состояния организма при длительном потреблении питьевой воды, обработанной энергоинформационными технологиями // Материалы VI Международного конгресса «Вода: экология и технологии» Экватэк 2004. Ч.2. – Москва, 1-4 июня 2004. - с.1003.
15. Беляева Н.Н. Морфофункциональное исследование воздействия коротких углеродных нанотрубок на печень // VIII Международный симпозиум «Экология человека и медико-биологическая безопасность населения» Сборник материалов. - Венгрия-Австрия, 20-29 октября 2012. – С. 13-19.
16. Бурцева А.С. Влияние электроактивированных водных растворов на динамику артериального давления у животных в эксперименте // V Междун. конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине». – Сб. тез. - СПб, 2009. URL: www.biophys.ru/archive/congress2009/abs-pr43.pdf (дата обращения 10.10.2013).

17. Брездынюк А.Д. Влияние электроактивированных водных растворов на репродуктивную функцию: автореф. дисс. ... канд. мед. наук. - Курск, 2007. - 22с.
18. Бытовой активатор воды (электроактиватор) АП-1. Интернет сайт научно-производственного предприятия "Акваприбор". URL: <http://www.aquapribor.com/ap1.php#pass> (дата обращения 10.09.2013).
19. Владимиров Ю.А. Активированная хемилюминесценция и биолюминесценция как инструмент в медико-биологических исследованиях // Соросовский образовательный журнал. – 2001. - Т.7. - №1. - с.16-23. URL: http://www.chemilum.ru/files/pub_luminmedbio.pdf (дата обращения 12.09.2013).
20. Вода – космическое явление. Кооперативные свойства и биологическая активность / под ред. акад. РАМН Ю.А.Рахманина, В.К.Кондратова - М.: РАЕН, 2002. - 427с.
21. Выписка из протоколов испытаний №334.0405, №335.0405, №339.0405 от 28 апреля 2005г. Испытательная лаборатория ЗАО «ЭкООнис». Официальный сайт производителя устройств Авадиск ООО «Аква-система». URL: <http://www.aqvadisk.ru/articles/147/104/issledovaniya.html> (дата обращения 12.11.2013).
22. Гайдарова А.П., Хорина Ю.А., Корощенко Г.А., Серкина О.А., Хачатрян А.П., Ларионов П.М., Айзман Р.И. Влияние электроактивированных водных растворов на морфофункциональные показатели поджелудочной железы и почек крыс с экспериментальной моделью сахарного диабета // Электронный журнал «Вестник Новосибирского государственного педагогического университета». – 2012. - №4(8). - С.53-60. URL: <http://vestnik.nspu.ru/article/227> (дата обращения 25.07.2013).
23. Гиберт К.К., Карасев А.К., Марасанов А.В., Стехин А.А., Яковлева Г.В. Оценка направленности биологического действия концентрата гелиопротекторной питьевой воды //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. акад. РАМН Ю.А.Рахманина. – Москва, 12-13 декабря 2013. - С.73-75.
24. Гиберт К.К., Стехин А.А., Яковлева Г.В., Сульина Ю.С. Стабильная электрононасыщенная питьевая вода // 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. акад. РАМН Ю.А.Рахманина. – Москва, 12-13 декабря 2013. - С.75-78.
 25. Гигиенические основы питания, качество и безопасность пищевых продуктов: Учебник / под ред. В.М. Поздняковского. – 5-е изд. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та, 2007. – 455с.
 26. ГН 2.1.5.1315-03 Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования. – М.: Российский регистр потенциально опасных химических и биологических веществ Министерства здравоохранения Российской Федерации (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 27.04.2003).
 27. Гомбоев Д.Д. Физиологическое обоснование действия электрохимически активированных растворов поваренной соли на организм животных: автореф. дис. ... докт. биол. наук. - Новосибирск, 2009. – 36 с.
 28. Гридин А.А. Применение электроактивированных водных растворов в лечении больных с гнойными ранами: автореф. дисс. ... канд. мед. наук. - Воронеж, 2005. - 17с.
 29. Гуськов А.С., Ингель Ф.И., Юрцева Н.А., Коровин В.Н., Губернский Ю.Д., Корпухин В.А., Лепихов П.В. Исследование мутагенных эффектов ионизированного воздуха // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2005. - № 11. - С.81-88.
 30. Даабуль С.А., Поцелуева М.М. Влияние структурированной воды «Ренорм» на выживаемость животных с асцитной гепатомой Зайделя // Материалы VI

- Международного конгресса «Вода: экология и технологии» Экватэк 2004. Ч.2. – Москва, 1-4 июня 2004. - С.974-975.
31. Даабуль С.А., Доценко В.А., Мосийчук Л.В. Влияние структурированной воды «Ренорм» на клинический статус больных ИБС, ГБ у лиц с избыточной массой тела и ожирением // Материалы VI Международного конгресса «Вода: экология и технологии». Ч.2. – Москва, 1-4 июня 2004. - С. 975.
 32. Даабуль С.А. Способ Даабуля нормализации и стабилизации гомеостаза макрофагов при лечении онкологических заболеваний. Патент № RU 2317820. Приоритет от 14.12.2005. Публикация 27.02.2008. Бюл. №6.
 33. Даленов Е.Д., Абдулдаева А.А., Сливкина Н.В., Пятов Е.А., Балкешева З.М., Никитина Т.П., Курбатова К.А. Качество жизни детей на фоне потребления биогенной воды «Туран» // Вестник Межнационального центра исследований качества жизни. – 2012. - № 19-20. - С.72-82.
 34. Есиев С.С., Агнаев В.Х. Способ получения активной воды или раствора. Патент РФ № 2151742 Приоритет от 30.09.1996. Публикация 27.06.2000.
 35. Журков В.С., Ахальцева Л.В., Неяскина Е.В., Михайлова Р.И., Кирьянова Л.Ф., Рыжова И.Н., Сковронский А.Ю. Суммарная мутагенная активность (СМА) хлорированной воды поверхностных водоисточников до и после обработки на установке «Грандер» // Материалы VI Международного конгресса «Вода: экология и технологии» Экватэк 2004. Ч. 2. – Москва, 1-4 июня 2004. - С.1004-1005.
 36. Закс Л. Статистическое оценивание. - М.: Статистика, 1976. – 598 с.
 37. Зыков Е.Д., Зыкова Т.Н. Кондиционированная питьевая вода высшей категории качества. Патент РФ № 2286952. Приоритет от 27.04.2004. Публикация 10.11.2006.
 38. Извеков Л.Л., Извекова Е.В., Камынин Ю.А. Устройство для доочистки питьевой воды «Аквадиск». Патент РФ № 2182122. Приоритет от 03.08.2001. Публикация 10.05.2002.
 39. Изюмов Ю.Г., Литвинова Е.М., Шварцман П.Я. Реализация повреждений, индуцированных этиленмином на разных стадиях сперматогенеза, при

- хранении спермы в семяприемниках интактных самок // Химический мутагенез: Сб. науч. трудов.- Л.: Изд-во ЛГПИ им. А. И. Герцена, 1976.- С.64-70.
40. Ингель Ф. И., Юрченко В. В, Гуськов А. С. и др. Показатели пролиферативной активности и их связь с генетическими повреждениями лимфоцитов крови при культивировании в условиях цитокинетического блока // Вестник РАМН.- 2005.-№ 4 - С.41-46.
41. 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. - вып.3. - С.7-19.
42. Ингель Ф.И. Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока. Часть 2. Влияние факторов среды и индивидуальных особенностей доноров в системе оценки нестабильности генома человека // Экологическая генетика. – 2006. - Т.IV. - вып.4. - С.39-54.
43. Ингель Ф.И., Юрченко В.В., Гуськов А.С., Кривцова Е.К., Юрцева Н.А. Показатели пролиферативной активности и их связь с генетическими повреждениями лимфоцитов крови при культивировании в условиях цитокинетического блока // Вестник РАМН. – 2006. - № 4. – С.41-46.
44. Ингель Ф.И. Отчет о пилотном исследовании влияния структуры воды на показатели нестабильности и чувствительности к действию мутагена лимфоцитов периферической крови человека. – Москва, 2008.
45. Ингель Ф.И., Кривцова Е.К, Юрченко в.В., Хусаинова Ш.Н., Косдаулетова Г.А., Легостаева Т.Б., Анциферов Б.М., Иванов С.И. Учет эмоционального напряжения взрослых и детей при оценке влияния факторов окружающей среды на на стабильность и чувствительность генома. Итоги и перспективы // Гигиена и санитария. – 2011. - №5. - С.44-48.
46. Инструкция по применению дезинфицирующего раствора анолита нейтрального, полученного на установках типа "АКВАМЕД" в лечебно-

- профилактических организациях. Интернет сайт научно-производственного предприятия "Акваприбор". URL: <http://www.aquapribor.com/aquamed.php#profil> (дата обращения 10.08.2013).
47. Ионизаторы воды PTV-K, PTV-A. Техническое описание и инструкция по эксплуатации. Сайт предприятия «Бурбулюкас». URL: http://burbuliukas.lt/wp-content/uploads/2012/07/ptv-a-ru_instr.pdf (дата обращения 02.10.2013).
 48. ИСО 6887-1:1999 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка образцов для испытания, исходной суспензии и десятичных разведений для микробиологических исследований. Часть 1. Общие правила приготовления исходной суспензии и десятичных разведений. - изд.1. – ISO/TC 34/SC 9. – 5с.
 49. Каврук Л.С. Е.А.Зиборова Применение анолита АНК при кишечной инфекции // Ветеринарный консультант. - 2002. - № 23. - С.6.
 50. Казанкин Д.С., Широнос В.Г. Исследование влияния бесконтактно активированной воды на электрокинетические свойства дрожжевых клеток // III Международный симпозиум «Электрохимическая активация в медицине, сельском хозяйстве, промышленности». - Сб. тез. - Москва, 2002. – С.190-194. URL: <http://www.ikar.udm.ru/files/zip/sb33-2.zip> (дата обращения 05.11.2013).
 51. Кластерная вода. Описание: 180 Life System® Cluster X2. Сайт официального дилера компании NHTGlobal в России. URL: http://nhtglobal.org/product/klaster_naya_voda (дата обращения 12.09.2013).
 52. Кныш Ю.А. Душ-массажный аппарат. Патент № 2221539. Приоритет от 22.06.2000. Публикация 20.01.2004.
 53. Козак М.Ф. Дрозофила – модельный объект генетики: учебно-методическое пособие для студентов. – Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет», 2007. – 87 с.

54. Красовский Г.Н., Егорова Н.А. Хлорирование воды как фактор повышенной опасности для здоровья населения // Гигиена и санитария. - 2003. - № 1. - С. 17-21.
55. Красовский Г.Н., Егорова Н.А. Гармонизация гигиенических нормативов с зарубежными требованиями к качеству питьевой воды // Гигиена и санитария. - 2005. - №2. - С.10-13.
56. Леонов Б.И., Прилуцкий В.И., Бахир В.М. Физико-химические аспекты биологического действия электрохимически активированной воды. - М.: ВНИИИМТ, 1999. – 244 с.
57. Лехтлаан-Тыниссон Н.П., Цыганков А.И., Краева Л.А. Влияние водопроводной воды, обработанной дифференцированным НЧ сигналом генератора на активность роста микроорганизмов *Staphylococcus aureus* // V Межд. конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине». – Сб. тез. - СПб, 2009. URL: www.biophys.ru/archive/congress2009/abs-p59.pdf (дата обращения 10.08.2013).
58. Лехтлаан Н.П., Цыганков А.И. Способ магнитной обработки жидкости. Патент РФ № 2401809. Приоритет от 10.02.2009. Публикация 20.10.2010.
59. Литвинова Е.М., Шварцман П.Я. Изучение механизмов инактивации и мутагенеза при действии этиленimina на половые клетки *Drosophila melanogaster*. Поздняя эмбриональная гибель // Генетика. - 1973. - Т.9. - № 7. - С.73-79.
60. Лобышев В.И. Вода как сенсор слабых воздействий физической и химической природы // Рос. хим. ж. (ЖРХО им. Д.И.Менделеева). – 2007. – Т.57. - №1. - С.107-114.
61. Луцевич И.Н. Гигиеническая оценка трансформации сложных органических веществ, образующихся в результате обеззараживания питьевой воды хлором // Казанский медицинский журнал. - 2003. - Т.84. - № 2. - С.142-145.
62. Медведев Н.И. Практическая генетика. – М.: Наука, 1968. – С. 294.

63. Медико-биологическая оценка активности и безопасности воды «Туран»: отчет о научно-исследовательской работе. Сайт АО «Кокшетауминводы». URL: <http://voda.kmw.kz/PDF/science/turan.pdf> (дата обращения 27.10.2013).
64. Мендельсон Г.И. Доминантные летальные мутации у различных видов дрозофилы как тест для оценки мутагенного действия загрязнителей окружающей среды: Авторефер. дисс. ... канд. биол. наук.– М., 1992.- 24 с.
65. Минаков В.В., Широносков В.Г., Широносова Г.И. Обоснование новой модификации бытового электрохимического очистителя, производящего питьевую воду с заданным составом и свойствами (по pH и ОБП) и моющие, антисептические растворы // 2-й Межд. симп. "ЭХА в медицине, с/х, промышленности". - М., 28-29 октября 1999. - С.334. URL : <http://www.ikar.udm.ru/sb/sb15-13.htm> (дата обращения 23.08.2013).
66. Михайлова Р.И., Савостикова О.Н., Рыжова И.Н., Алексеева А.В. Изменение физико-химического состояния воды при взаимодействии с наночастицами различного химического состава // VI Международный симпозиум «Экология человека и медико-биологическая безопасность населения». – Тез. докл. - Греция, 24 октября-03 ноября 2010 – С. 114-117.
67. Модели ионизаторов для КАНГЕН воды. Сайт ООО «Канген» . URL: <http://kangen.ru/index.php?categoryID=560> (дата обращения 12.08.2013).
68. Мосин О.В. Водоподготовка и водоотведение // Сантехника. Отопление. Кондиционирование. Энергосбережение. – 2012. - №12. URL: <http://www.c-o-k.ru/articles/elektrohimicheskaya-obrabotka-vody> (дата обращения 10.05.2013).
69. Мошков Н.Е. Симметрия и размеры ядер двуядерных лимфоцитов как показатели генотоксической активности веществ: тестовое исследование N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидина // Токсикологический вестник. - 2012 - № 3. - С.14-19.
70. Мрикаева О.М., Дзугкоева Ф.С. Влияние электрохимически активированной воды (ЭХАС) на активность ферментов АОЗ у интактных кроликов // Фунд. иссл. – 2012. - №3. – С.250-252.

71. Неумывакин И.П. Перекись водорода: мифы и реальность. - 2-е перераб. изд. - СПб.: Изд. ДИЛЯ, 2005. - 144 с.
72. Оборудование для очистки и ионизации питьевой воды т.м. "AQUASPECTR WAND": ионизатор. Свидетельство о государственной регистрации RU.40.01.05.013.E.003963.06.12 от 18.06.2012 Сервер поиска по Реестрам Роспотребнадзора и сан.-эпид. службы России (дата обращения 10.08.2013).
73. Осипова И.Г., Михайлова Р.А., Сорокулова И.Б., Васильева Е.А., Гайдеров А.А. Споровые пробиотики // Журнал микробиологии, вирусологии и иммунологии. - 2003. - №3. - С.113-119.
74. Отличия "Божей росы" от других марок вод. Сайт компании «Термо Премьер». URL: <http://vodarosa.ru/otlichia> (дата обращения 15.02.2014).
75. Отчет по договору о научном сотрудничестве № 1н-01-06 между ОАО «Аква-Система» и ГОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет Росздрава». Показатели гомеостаза организма человека при употреблении структурированной воды, полученной с помощью прибора «Аквадиск». Официальный сайт производителя устройств Авадиск ООО «Аква-система». URL: <http://www.aqvadisk.ru/articles/147/164/issledovaniya.html> (дата обращения 25.10.2013).
76. Пискарев И.М., Ушканов В.А., Лихачев П.П., Мысливец Т.С. Окислительно-восстановительный потенциал воды, насыщенной водородом // Электронный журнал «Исследовано в России». - 2007. - № 23. - С. 230–239. URL: <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2007/023.pdf>. (дата обращения 18.05.2013).
77. Пискарев И.М., Туголуков С.Н., Милявский М.А., Волков Л.С. Устройство для получения жидкой среды с отрицательным окислительно-восстановительным потенциалом путём насыщения её водородом. Патент на полезную модель № 71332. Приоритет от 13.08.2007. Публикация 10.02.2008.

78. Пискарев И.М., Ушканов В.А., Лихачев П.П., Мысливец Т.С. Окислительно-восстановительный потенциал воды, насыщенный водородом // Электронный журнал "Исследовано в России" – 2007. №023. - С.230 – 239.. URL: <http://zhurnal.apelarn.ru/articles/2007/023.pdf>. (дата обращения 10.02.2013).
79. Поветкин С.Н. Получение, фармакологические свойства и применение электрохимически активированной воды при эшерихиозах и сальмонеллезе поросят: автореф. дисс. ... канд. ветер. наук. - Краснодар, 2009. - 25с.
80. Постнов С.Е., Мезенцева М.В., Подчерняева Р.Я., Данлыбаева Г.А., Сургучева И.М., Гринкевич О.М., Лопатина О.А., Бакланова О.В. Новые подходы в биомедицинской технологии на основе воды пограничного слоя // Биомедицинская радиотехника. - 2009, №1, с.3-15.
81. Прилуцкий В.И., Бахир В.М. Электрохимически активированная вода: аномальные свойства, механизм биологического действия. - М.: ВНИИИМТ, 1997. – 228 с.
82. Прилуцкий В.И., Бахир В.М., Шомовская Н.Ю. Дезинфицирующие средства: эффективность, безопасность, экология // Экология и промышленность России. – 2003. – октябрь. – С. 31-34.
83. Прохорова И.М., Ковалева М.И., Фомичева А.Н. Генетическая токсикология: учебное пособие. - Ярославль: ЯрГУ, 2005. - 132 с.
84. Пятов Е.А., Задорожный А.П.. Производство «живой» воды // Питьевая вода. – 2004. - №3. - С.27-29.
85. Пятов Е.А., Задорожный А.П. К вопросу о роли активированной природной минеральной воды в повышении гемоглобина крови человека на примере биогенной воды Туран // 8-я Международная выставка и конгресс «Вода: экология и технология» Экватэк 2008. – Сб. докл. – Москва, 3-6 июня 2008.
86. Расчепеев Д.А. Применение электроактивированных водных растворов в лечении больных с гнойными артритами (экспериментально-клиническое исследование): автореф. дисс. ... канд. мед. наук. - Воронеж, 2011. - 24с.

87. Рахманин Ю.А., Стехин А.А., Яковлева Г.В. Структурно – энергетические изменения воды и ее биологическая активность // [Гигиена и санитария](#). - 2007. - № 5. - С. 34-36.
88. Рахманин Ю.А. Бутилированные воды: достоинства и недостатки в деле обеспечения населения доброкачественной питьевой водой // H_2O : вода и водные технологии. – 2008. - №20/21. - С.4-6.
89. Рахманин Ю.А. Методические аспекты исследований по разработке физических методов активации биологических свойств воды и их гигиенической оценке. VIII Международный симпозиум «Экология человека и медико-биологическая безопасность населения» Сборник материалов. - Венгрия-Австрия, 20-29 октября 2012. – С. 3-8.
90. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. Гигиенические критерии состояния окружающей среды №51. - ВОЗ. - Женева, 1989. - 212 с.
91. Руководство по обеспечению качества питьевой воды. Том1. Рекомендации. - ВОЗ. - 3-е изд. – Женева, 2004. - 121с.
92. Резников К.М., Брездынюк А.Д., Трофимова Т.Г.. Совместимость электроактивированных водных растворов с водными системами организма // V Межд. конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине» - Сб. тез. - СПб, 2009, URL: www.biophys.ru/archive/congress2009/abs-p70.pdf (дата обращения 25.05.2013).
93. Савостикова О.Н. Гигиеническая оценка влияния структурных изменений в воде на ее физико-химические и биологические свойства: дисс. ... канд. мед. наук. - М.: ГУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина РАМН, 2008. – 160с.
94. Савостикова О.Н., Алексеева А.В., Кирьянова Л.Ф., Кочеткова М.Г. Изучение каталитической активности наночастиц различного химического состава. // VI Международный симпозиум «Экология человека и медико-

- биологическая безопасность населения». – Тез. докл. - Греция, 24 октября-03 ноября 2010. – С. 127-129.
95. СанПиН 2.1.4.1074-01 Санитарные правила и нормы «Вода питьевая. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. - М.: Информ.-изд.центр МЗ РФ, 2001.- 134 с.
 96. СанПиН 2.1.4.1116-02 Санитарные правила и нормы «Вода питьевая. Гигиенические требования к качеству воды расфасованной в емкости. Контроль качества. - М.: Информ.-изд. центр МЗ РФ, 2002. - 74с.
 97. Сидорская В. А. Разработка новых тест-систем *Drosophila melanogaster* для оценки отрицательных последствий загрязнения окружающей среды: автореф. дисс. ... канд. биолог. наук. – Арзамас: Арзамасский государственный педагогический институт, 2000. – 17с.
 98. Сковронский А.Ю. Гигиеническая оценка вод, обработанных новыми энергоинформационными технологиями: дисс. ... канд. мед.наук. - М.: ГУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина РАМН, 2004. – 137с.
 99. Спитковский Д.М., Кузьмина И.В., Макаренков А.С., Терехов А.С., Карпухин А.В. Перемещение локуса интерфазной хромосомы, индуцированное низкими дозами радиации // Радиационная биология и радиоэкология. - 2002 - Т.42. - №6.- С.604-607.
 100. Стехин А.А., Яковлева Г.В. Структурированная вода: нелинейные эффекты. - М.: Изд. ЛКИ, 2008. - 325с.
 101. Стрижельчик Н. Г. Исследование модифицирующих свойств синего света на *Drosophila melanogaster* Mg. (Diptera: Drosophilidae) // Изв. Харьк. энтомол. о-ва. — 2011. — Т. XIX, вып. 1. — С. 77–78.
 102. Сычева Л.П., Коваленко М.А., Шереметьева С.М., Журков В.С., Михайлова Р.И., Кирьянова Л.Ф., Сковронский А.Ю., Олесинов А.А. Оценка цитогенетических показателей в клетках разных органов крыс при длительном потреблении воды при разных способах водоподготовки //

- Материалы VI Международного конгресса «Вода: экология и технологии» Экватэк 2004. Ч.2. – Москва, 1-4 июня 2004. - с.993.
103. Тимаков А.А., Турова Е.А., Головач А.В., Акимова Б.К. Способ лечения больных сахарным диабетом. Патент РФ №2270017. Приоритет от 08.07.2004. Публикация 20.02.2006. Бюл.№5.
 104. Тимошевский В.А., Назаренко С.А. Биологическая индикация мутагенных воздействий и генетической нестабильности у человека путем учета числовых хромосомных нарушений // Вестник ВОГиС. – 2006. – Т.10. - № 3. - С.530-539.
 105. Тихомирова М. М. Генетический анализ. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1990. - 280 с.
 106. Установки для доочистки, обеззараживания, кондиционирования питьевой воды и придания ей антиоксидантных свойств "Изумруд" ("Izumrud"). Санитарно-эпидемиологическое заключение № 77.99.34.485.Д.010314.06.10 от 29.06.2010 г. Сервер поиска по Реестрам Роспотребнадзора и сан.-эпид. службы России URL: http://fp.crc.ru/fr/?oper=s&blank=1&uinz=*СК9%2В.ТS%3BS%40 (дата обращения 10.08.2013).
 107. Филимонов И.Г., Маклаков А.И., Олефир А.Ф. Способ получения активированной воды и устройство ее осуществления. Патент РФ № 2470874. Приоритет от 08.06.2011. Публикация 27.12.2012. Бюл. № 36.
 108. Хачатрян А.П., Спиридонов А.Н. Способ бесконтактной электроактивации жидкости и устройство для его реализации. Патент РФ № 2236378. Приоритет от 22.11.2002. Публикация 20.09.2004.
 109. Хромых Ю.М. Некоторые особенности методики разведения дрозидов и учета частоты доминантных летальных мутаций // Химический мутагенез: Сб. науч. работ. - Л., 1974. - С.120-128.
 110. Худолей В.В. Выявление мутагенности химических канцерогенов и первичная профилактика рака: теоретические и практические аспекты // Первичная профилактика рака: Сб. науч. трудов. - М., 1986. - С.41-47.

111. Худолей В.В. Канцерогены: характеристики, закономерности, механизмы действия. - СПб., 1999. – 373 с.
112. Шапигузов А.Ю. Аквапорины: строение, систематика и особенности регуляции // Физиология растений. – 2004. - Т.51. - № 1. - С.1–11.
113. Шварцман П.Я., Сондре З.А., Филиппова О.Д. Модификация кофеином частоты индуцированных этиленимином и этилметансульфонатом соматических мутаций и митотического кроссинговера у *Drosophila melanogaster* // Генетика. - 1980. - №2. - С.299-308.
114. Широносков В.Г., Широносков Е.В. Устройство для бесконтактной активации жидкости. Патент РФ № 2194017. Приоритет от 10.04.2000. Публикация 10.12.2002.
115. Широносков В.Г., Курганович В.С. Устройство для активации жидкости. Патент РФ № 2299859 Приоритет 19.09.2005. Публикация 27.05.2007.
116. Широносков В.Г., Напольских В.М., Сорокин Э.П., Кубашев А.П. Применение бесконтактно-активированных инфузионных растворов для профилактики послеоперационного панкреатита у онкобольных // IV Межд. конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине» - Сб. тез. - СПб, 3-7 июля 2006. - С.218.
117. Широносков В.Г., Минаков В.В., Широносков О.В., Широноскова Г.И., Иванов В.Б. Приготовление питьевой воды высшего качества // Экология и промышленность России, март 2008, с. 4-7, URL: <http://ikar.udm.ru/files/pdf/sb43-1.pdf> (дата обращения 12.07.2013).
118. Электрические ионные активаторы воды (ионизаторы для воды) с комплектующими и фильтрами т.м. HydraCide® Свидетельство о государственной регистрации RU.32.БО.21.008.Е.000704.11.11 от 02.11.2011. Сервер поиска по Реестрам Роспотребнадзора и сан.-эпид. службы России (дата обращения 10.08.2013).
119. Эльпинер Л.И. О влиянии водного фактора на состояние здоровья населения России // Водные ресурсы. - 1995. - Т.22. - №4. - С.418-425.

120. Эльпинер Л.И. Медико-экологические аспекты кризиса питьевого водоснабжения // Гигиена и санитария. - 2013. - №6. - С.38-44.
121. Юрченко В.В., Кривцова Е.К., Беяева Н.Н., Ингель Ф.И., Олесинов А.А., Савостикова О.Н., Сковронский А.Ю. Использование микроядерного теста для оценки питьевых вод // Гигиена и санитария. - 2008. - № 6. - С.49-53.
122. Abe M., Sato S., Toh K., Hamasaki T., Nakamichi N., Teruya K., et al. Suppressive effect of ERW on lipid peroxidation and plasma triglyceride level. In M. Kamihira, et al. (Eds.) // Animal cell technology: Basic & applied aspects. - 2010. - Vol.16. – P.315-321. Dordrecht: Springer.
123. Abo-Enein H., Gheith O.A., Barakat N., Nour E., & Sharaf, A.-E. Ionized alkaline water: new strategy for management of metabolic acidosis in experimental animals // Therapeutic Apheresis and Dialysis. – 2009. – Vol.13. – P.220-224.
124. Activating drinking water for home and mobile use: 3 QUELLEN PULSATOR. Website of Denk Aqua GmbH. URL: http://www.denk-aqua.de/img/pulsator_en.pdf (дата обращения 20.12.2013).
125. Agre P., Kozono D. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases // FEBS Lett. - 2003. - V.555(1) - P.72-78.
126. Alexander ML, Bergendahl J. Dose rate effect in the developing germ cells of male *Drosophila* // Genetics. – 1964 Jan. - V.49 – P.1-16.
127. Belitsky G.A., Lytcheva T.A., Khitrovo I.A., Safaev R.D., Zhurkov V.S., Vyskubenko I.F., Sytshova L.P., Salamatova O.G., Feldt E.G., Khudoley V.V., Mizgirev I.V., Khovanova E.M., Ugnivenko E.G., Tanirbergenov T.B., Malinovskaya K.I., Revazova Y.A., Ingel F.I., Bratslavsky V.A., Terentyev A.B., Shapiro A.A. & Williams G.M. Genotoxicity and carcinogenicity testing of 1,2-dibromopropane and 1,1,3-tribromopropane in comparison to 1,2-dibromo-3-chloropropane // Cell Biol. Toxicol. – 1994. – V.10 – P.265–279.

128. Bolognesi C, Fenech M. Micronucleus assay in human cells: lymphocytes and buccal cells // *Methods Mol Biol.* – 2013. – V.1044 – P.191-207. doi: 10.1007/978-1-62703-529-3_10.
129. Borkotoky D, Panda SK, Sahoo GR, Parija SC. Genotoxicity of nimesulide in Wistar rats // *Drug Chem Toxicol.* - 2014 Apr. – V.37(2).- P.178-183. doi: 10.3109/01480545.2013.834357.
130. Chapman K.E., Thomas A.D., Wills J.W., Pfuhler S., Doak S.H. and Jenkins G.J.S. Automation and validation of micronucleus detection in the 3D EpiDerm™ human reconstructed skin assay and correlation with 2D dose responses // *Mutagenesis.* - Advance Access publication 27 March 2014. - vol.29. - №3 – P.165–175. doi:10.1093/mutage/geu011, URL: <http://mutage.oxfordjournals.org/content/29/3/165.full.pdf+html?sid=6ed3e75c-5ff5-4785-aa5e-eb875319b481> (дата обращения 21.02.2014).
131. Cloete T.E., Thantsha M.S., Maluleke M.R. and Kirkpatrick R. The antimicrobial mechanism of electrochemically activated water against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* as determined by SDS-PAGE analysis // *Journal of Applied Microbiology.* – 2009. – V.107. - №2. – P.379–384. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04233.x.
132. Das PP, Shaik AP, Jamil K. Genotoxicity induced by pesticide mixtures: in-vitro studies on human peripheral blood lymphocytes // *Toxicol Ind Health.* - 2007 Sep. – V.23(8). – P.449-458.
133. Di Virgilio A. L., Reigosa M., Arnal P. M. Fernandez Lorenzo de Mele M. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells // *Journal of hazardous materials.* - 2010. – V.177. – P.711-718.
134. Eichner J., Wrzodek C., Römer M., Ellinger-Ziegelbauer H., Zell A. Evaluation of toxicogenomics approaches for assessing the risk of nongenotoxic carcinogenicity in rat liver // *PLoS One.* – 2014. V.9(5). - e97678. doi: 10.1371/journal.pone.0097678. eCollection 2014.

135. Eugene Cloete Electrochemically activated water as a non polluting biofilm control technology. URL: http://www.aquaiox.net/uploads/biofilm_control.pdf (дата обращения 17.08.2013).
136. Eventi A, Lubrano V, Scarpato R, Turchi G. Protective effects of plicatin B on micronucleus induction in cultured human lymphocytes by different mutagens // Food Chem Toxicol. – 2009 Jan. – V.47(1). – P.124-128. doi: 10.1016/j.fct.2008.10.017.
137. Fenech M. The in vitro micronuclei test technique // MutatRes. -2000.- V.455.- P.81-95.
138. Fenech M., Chang W.P. and Kirsch-Volders M. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures / Mut. Res. – 2003. - V.534. - №1. – P.65-75.
139. [Ferreira de Oliveira JM.](#), [Remédios C.](#), [Oliveira H.](#), [Pinto P.](#), [Pinho F.](#), [Pinho S.](#), [Costa M.](#), [Santos C.](#) Sulforaphane induces DNA damage and mitotic abnormalities in human osteosarcoma MG-63 cells: correlation with cell cycle arrest and apoptosis // [Nutr Cancer](#). – 2014. - V.66. - №2. - P.325-334. doi: 10.1080/01635581.2014.864777.
140. Geter DR., Bhat VS., Gollapudi BB., Sura R., Hester SD. Dose-response modeling of early molecular and cellular key events in the CAR-mediated hepatocarcinogenesis pathway // Toxicol Sci. – 2014 Apr. – V.138(2). – P.425-445. doi: 10.1093/toxsci/kfu014.
141. Giunta S., Jackson SP. Give me a break, but not in mitosis: the mitotic DNA damage response marks DNA double-strand breaks with early signaling events // Cell Cycle. – 2011. – V.15. - №10(8). – P.1215-1221.
142. Gonzalez L., Thomassen L. and Plas G. Exploring the aneugenic and clastogenic potential in the nanosize range: A549 human lung carcinoma cells and amorphous monodisperse silica nanoparticles as models // Nanotoxicology. - 2010. – V.4. - P.382-395.

143. Gonzalez L., Sanderson B.J. S. and Kirsch-Volders M. Adaptations of the in vitro MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials // *Mutagenesis*. - 2011. - Vol. 26(1). – P.185-191.
144. Hanaoka K., Sun D., Lawrence R., Kamitani Y., Fernandes G. The mechanism of the enhanced antioxidant effects against superoxide anion radicals of reduced water produced by electrolysis // [Biophys Chem](#). - 2004 Jan. - 107(1). – P.71-82.
145. Harrison JC., Haber JE. Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint // *Annu Rev Genet*. – 2006. - V.40. – P.209–235.
146. Huang KC., Yang CC., Hsu SP., Lee KT., Liu HW., Morisawa S., Otsubo K., Chien CT. Electrolyzed-reduced water reduced hemodialysis-induced erythrocyte impairment in end-stage renal disease patients // *Kidney Int*. - 2006 Jul. – V.70(2). – P.391-398. Epub 2006 Jun 7.
147. Huang X., Tran T., Zhang L., Hatcher R., Zhang P. DNA damage-induced mitotic catastrophe is mediated by the Chk1-dependent mitotic exit DNA damage checkpoint // *Proc Natl Acad Sci U S A*. -2005. – V.102(4). – P.1065-1070.
148. Ingel F., Erdinger L., Eckl P., Khussainova Sh., Krivtsova E. Genomic Instability, Radiosensitivity and Adaptive Response of Blood Lymphocytes from Children Living in the Aral Sea Region: Correlation with Emotional Stress and Blood Contamination // *Central European Journal of Occupational and Environmental Medicine*. – 2010. - Vol.16. - №1-2. - P.31-45. URL: http://www.omfi.hu/cejoem/Volume16/Vol16No1-2/CE10_1-2-04.html (дата обращения 15.03.2014).
149. Karlsson Th., Bolshakova A., Magalhães M.A.O., Loitto V.M., Magnusson K.E. Fluxes of Water through Aquaporin 9 Weaken Membrane-Cytoskeleton Anchorage and Promote Formation of Membrane Protrusions // *PLoS ONE*. – V.8(4). - published 03 Apr 2013. - e59901. doi:10.1371/journal.pone.0059901.
150. Kaur P., Sharma N., Singh B., Kumar S., Kaur S. Modulation of genotoxicity of oxidative mutagens by glycyrrhizic acid from *Glycyrrhiza glabra* L // *Pharmacognosy Res*. - 2012 Oct. – V.4(4). – P.189-195. doi: 10.4103/0974-8490.102260.

151. Kim MJ., Jung KH., Uhm YK., Leem KH., Kim HK. Preservative effect of electrolyzed reduced water on pancreatic beta-cell mass in diabetic db/db mice // Biol Pharm Bull. - 2007 Feb. – V.30(2). – P.234-236.
152. Kinjo T., Ye J., Yan H., Hamasaki T., Nakanishi H., Toh K., Nakamichi N., Kabayama S., Teruya K., [Shirahata S.](#) Suppressive effects of electrochemically reduced water on matrix metalloproteinase-2 activities and in vitro invasion of human fibrosarcoma HT1080 cells // Cytotechnology. -2012 May. – V.64(3). – P.357-371. doi: 10.1007/s10616-012-9469-7. Epub 2012 Jun 14.
153. Kiura H., Sano K., Morimatsu S., Nakano T., Morita C., Yamaguchi M., Maeda T., Katsuoka Y.J. Bactericidal activity of electrolyzed acid water from solution containing sodium chloride at low concentration, in comparison with that at high concentration // Microbiol Methods. - 2002 May. - V.49(3). – P.285-93.
154. Koleva V.P., Dragoeva A.P., Andreeva A.I., Burova MT., Georgiev S., Enchev DD. Comparative analysis of clastogen-induced chromosome aberrations observed with light microscopy and by means of atomic force microscopy // Mutat Res. - 2013 Apr. 30. – V.753(1). – P.29-35. doi: 10.1016/j.mrgentox.2012.12.014.
155. Lederberg J. Tatum E.L. Gene recombination in E. coli (PDF) // Nature. - 1946 Oct. 19. – V.158. – P.558. doi: 10.1038/158558a0. URL: <http://profiles.nlm.nih.gov/ps/access/BBGASZ.pdf> (дата обращения 12.04.2013).
156. Li Y.-P., Nishimura T., Teruya K., Maki T., Komatsu T., Hamasaki T., et al. Protective mechanism of reduced water against alloxan-induced pancreatic b-cell damage: scavenging effect against reactive oxygen species // Cytotechnology. – 2002. – V.40. – P.139-149.
157. Marinho H.S., Real C., Cyrne L., Soares H., Antunes F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors // Redox Biology. – 2014. V.2. – P.535–562. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2014.02.006> (дата обращения 04.05.2014).

158. Minich D.M, Bland J.S. Acid-alkaline balance: role in chronic disease and detoxification // *Altern Ther Health Med.* - 2007 Jul-Aug. – V.13(4). – P.62-65.
159. Niida H., Nakanishi M. DNA damage checkpoints in mammals / *Mutagenesis.* – 2006. – V.21(1). – P.3-9.
160. OECD 487. In Vitro mammalian cell micronucleus test. Test Guideline 487. OECD, Paris, 2010.
161. OECD 475. Mammalian bone marrow chromosome aberration test. Test Guideline 475. OECD, Paris, 2009.
162. [Orth J.D.](#), Loewer A., Lahav G., Mitchison T.J. Prolonged mitotic arrest triggers partial activation of apoptosis, resulting in DNA damage and p53 induction // *Mol Biol Cell.* - 2012 Feb. – V.23(4). – P.567-576. doi: 10.1091/mbc.E11-09-0781.
163. Osada K., Li Y.-P., Hamasaki T., Abe M., Nakamichi N., Teruya K., et al. Anti-diabetes effects of Hita Tenryosui water, a natural reduced water. In K. Ikura, et al. (Eds.) // *Animal cell technology: Basic & applied aspects.* – 2010. - Vol. 15. – P.307-313. Dordrecht: Springer.
164. Parry J.M. A proposal for a new OECD Guideline for the in vitro micronucleus test. URL: <http://www.oecd.org/dataoecd>. (дата обращения 02.02.2013).
165. Plewa M.J. Wagner E.D., Kim A.C. et al. Mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity of new drinking water disinfection byproducts // *Environ. and Mol. Mutagenes.* - 2003. - V.41. - № 3. - P.199.
166. Saitoh Y., Harata Y., Mizuhashi F., Nakajima M., Miwa N. Biological safety of neutral-pH hydrogen-enriched electrolyzed water upon mutagenicity, genotoxicity and subchronic oral toxicity // *Toxicol Ind Health.* - 2010 May. – V.26(4). – P.203-216. doi: 10.1177/0748233710362989. Epub 2010 Mar 4.
167. Sies H. Role of Metabolic H₂O₂ Generation: Redox Signalling and Oxidative Stress // *J. Biol. Chem.* published online 10.02 2014. URL: <http://www.jbc.org/content/early/2014/02/10/jbc.R113.544635.full.html#ref-list-1> (дата обращения 29.05.2014).
168. Shirahata S., Nishimura T., Kabayama S., Aki D., Teruya K., Otsubo K., et al. (2001). Anti-oxidative water improves diabetes. In E. Lindner-Olsson, et al.

- (Eds.) // Animal cell technology: From target to market. - P.574-577. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
169. Smith L.E., Na-gar S., Kim G.J., Morgan W.F. Radiation-induced genomic instability: radiation quality and dose response // Health Phys. - 2003. - V.85. - № 1. - P.23-29.
 170. Stopper H., Schmitt E., Gregor C., .Mueller S.O., Fischer W.H. Increased cell proliferation is associated with genomic instability: elevated micronuclei frequencies in estradiol-treated human ovarian cancer cells // Mutagenesis. – 2003. - Vol.18. - №.3. - P.243–247.
 171. The World's Only Genuine V.O.W. Concentrate. Website of Pi(π)-Water technology by WONYONG Co., Ltd. URL: http://www.piwater.net/public_html/product_vow1.htm (дата обращения 25.09.2013).
 172. Titenko-Holland N., Jacob R.A., Shang N. et al. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in filate // Mutat Res.-1998.-V.417. - P.101-114.
 173. [Valerio-Santiago M](#) , [de Los Santos-Velázquez A I](#) , [Monje-Casas F](#). Inhibition of the mitotic exit network in response to damaged telomeres // [PLoS Genet.](#) – 2013. - V.9. № 10. - e1003859. doi: 10.1371/journal.pgen.1003859.
 174. Vogel E.W., Nivard M.J. The response of germ cells to ethylene oxide, propylene oxide, propylene imine and methyl methanesulfonate is a matter of cell stage-related DNA repair // Environ Mol Mutagen. – 1997. – V.29(2)/ - P.124-135.
 175. Werner Schmid et al. The Effect of Carbon Monoxide as a Respiratory Inhibitor on the Production of Dominant Lethal Mutations by X-Rays in Drosophila // Genetics — 1961. — P.663-670.
 176. Woodruff R.C., Mason J.M., Valencia R., Zimmering S. Chemical mutagenesis testing in Drosophila. V. Results of 53 coded compounds tested for the National Toxicology Program // Environ Mutagen. – 1985. – V.7(5). - P.677-702.
 177. Würigler F.E., Graf U. Mutagenicity testing with Drosophila melanogaster // Basic Life Sci. – 1985. – V.34. – P.343-372.

178. Wurgler F.E., Vogel E.W. In vivo Mutagenicity Testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster* // Chemical Mutagens. - Ed. de Serres F.J. -N.Y.: Plenum Press, 1986.-V.10. - P.1-72.
179. Yahagi N., Kono M., Kitahara M., Ohmura A., Sumita O., Hashimoto T., Hori K., Ning-Juan C., Woodson P., Kubota S., Murakami A., Takamoto S. Effect of Electrolyzed Water on Wound Healing // Artif Organs. - 2000 Dec. – V.24(12). – P.984-987
180. Yalçın E., Oruç E., Cavuşoğlu K., Yapar K. Protective role of grape seed extract against doxorubicin-induced cardiotoxicity and genotoxicity in albino mice // J Med Food. - 2010 Aug. – V.13(4). – P.917-925. doi: 10.1089/jmf.2009.0162.
181. Yan H., Tian H., Kinjo T., Hamasaki T., Tomimatsu K., Nakamichi N., et al. Extension of the lifespan of *Caenorhabditis elegans* by the use of electrolyzed reduced water // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. – 2010. – V.74. – P.2011-2015.
182. Ye J., Li Y., Hamasaki T., Nakamichi N., Komatsu T., Kashiwagi T., et al. Inhibitory effect of electrolyzed reduced water on tumor angiogenesis // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2008. – V.31. – P.19-26.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

Способы и устройства для активации питьевой воды

Принцип создания, механизм эффекта	Прибор	Физико-химические характеристики полученной воды	Ссылка
КОНТАКТНАЯ электрохимическая активация воды			
Электрохимическая активация жидкостей – перевод жидкостей в термодинамически неравновесное (активированное) состояние, характеризующееся повышенной физико-химической активностью. Процесс разложения воды электрическим током представляет собой физико-химическую модификацию состава водной среды с повышением концентрации ионов H^+ , OH^- .	Устройство для активации жидкостей, содержащее емкость для активируемой жидкости и электроды, один из которых расположен внутри емкости для активируемой жидкости, а внутри него размещены другие электроды – один или более, при этом полый электрод выполнен из полупроницаемого материала. Патент на данное устройство лег в основу создания контактных электрохимических активаторов (ионизаторов) «Изумруд-СИ»	При мощности 6 Вт ОВП в катодите от -390 до -750 мВ; при мощности 2,5 Вт ОВП в катодите от -360 до -770 мВ.	[115, 81, 65]
	Устройство для электрохимической активации воды, состоящее из емкости для активируемой жидкости, разделенной на две части непроницаемой перегородкой. В крышку емкости вмонтированы два электрода (анод и катод). Материал катода – пищевая сталь, анод выполнен из титана с платиновым покрытием. Серийные модели – электролизеры воды «РТV» и «Ива-1»	В зависимости от времени активации воды в катодите рН от 8 до 10,5, ОВП до -900мВ; в анолите рН от 2,5 до 5,5, ОВП до 1120 мВ.	[3, 47]

Принцип создания, механизм эффекта	Прибор	Физико-химические характеристики полученной воды	Ссылка
	Устройство для электрохимической активации воды, состоящее из основной емкости и керамического стакана, вставляемого в основную емкость. В нижней части крышки прибора установлены электроды: два химически стойких анода и два катода из нержавеющей стали. Во время активации аноды находятся в керамическом стакане, а катоды в основной емкости. Серийная модель электроактиватор воды бытовой «АП-1».	В зависимости от времени активации и степени минерализации исходной воды в анолите pH от 2,1 до 6,2; в католите pH от 9,4 до 11,0	[18]
	Устройство для получения нейтрального анолита из воды с добавлением в нее хлорида натрия (0,3% раствор). При электрохимическом анодном окислении воды образуется метастабильный дезинфицирующий раствор. Серийная модель – установка «Аквamed».	Для приготовления 200 л нейтрального анолита требуется 1 кг поваренной соли и 1кВт электроэнергии. Концентрация активного хлора в получаемом нейтральном анолите 0,02-0,04%	[46]
	Проточные электрохимические активаторы с электродами из титана с платиновым покрытием. Серийные модели - ионизаторы «Leveluk» (Япония)	В католите pH от 8,5 до 11,5; в анолите pH от 2,5 до 6,0	[67]
Обработка воды с помощью генератора холодной плазмы. Плазма образуется в газовой фазе при вспышечном коронном разряде на электродах в насыщенных парах воды. Образуются активные частицы: озон и гидроксильные радикалы.	Установка состоит из генератора холодной плазмы и угольного фильтра. Газовая смесь после генератора подается на эжектор, где происходит смешивание с водой 1:1. После контакта в течение 2-3 минут вода подается на угольный фильтр для удаления активных частиц. Приборы серии "Пилимин" марки БЭР-49-М.	Разложение токсичных органических соединений в обрабатываемой воде, удаление бактериологического загрязнения. Насыщение воды кислородом в диапазоне 9-70 мг/л.	[10]
НЕКОНТАКТНАЯ активация воды			

Принцип создания, механизм эффекта	Прибор	Физико-химические характеристики полученной воды	Ссылка
Неконтактная активация растворов (воды) с помощью контактно электрохимически активированных растворов. Неконтактная электрохимическая активация осуществляется на энергетическом уровне без сопутствующего транспорта (массопереноса) ионов через стенки емкости. При этом вода или водный раствор приобретают аномальные метастабильные свойства активированной жидкости без изменения их первоначального химического состава.	Устройство для контактной и неконтактной активации жидкости: содержит емкость для электрохимически активируемой жидкости с размещенными в ней электродами и тонкостенной емкостью для бесконтактно активируемой жидкости. Патент на данное устройство лег в основу создания электрохимического активатора (ионизатора) для контактной и неконтактной активации «Изумруд-СИ» (модели 04) и «Влада» Устройство для контактной и неконтактной активации жидкости, включающее камеру-электролизер цилиндрической формы с катодом и анодом для образования электрохимически активированной среды и размещающую в этой среде периодически или постоянно тонкостенную диэлектрическую емкость с активируемой жидкостью стационарного или проточного типа, в котором камера-электролизер снабжена нагревателем с терморегулятором для постоянного подогрева электрохимически активированной среды.	Исходные характеристики физ. раствора: рН=7,0; ОВП= 281 мВ, Характеристики неконтактно активированного физ.раствора: рН=7,2, ОВП= - 107мВ. Дистиллированная вода (ОВП=280±15мВ), нагретая до 42°C, помещалась в католит (ОВП=-890±20мВ) в тонкостенном пластиковом стакане на 60 минут. Через 5, 10, 20, 30 и 60 мин значения ОВП снизились соответственно на 10±5 мВ; 150±10 мВ; 250±15 мВ; 280±15 мВ; 320±20 мВ.	[114] [108]
Вода Й.Грандера имеет способность оказывать информационное влияние на необработанную воду дистанционно - через металлическую стенку. В процессе протекания через прибор информация передается водопроводной воде, вследствие этого водопроводная вода «освобождается от вредной информации».	Устройство для активации воды Й.Грандера (Австрия) – «оживитель воды» - проточный прибор из нержавеющей стали, имеющий внутри себя отсеки, заполненные информационной водой Грандера.	В водопроводной воде происходит увеличение водородного показателя (рН) до 7,2...8,5 и уменьшение окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) до +100...+300 мВ.	[20]
Механическая активация воды			
Активация воды с путем изменения	Опытная установка «Устройство получения	Время релаксации воды не менее 2-х	[107]

Принцип создания, механизм эффекта	Прибор	Физико-химические характеристики полученной воды	Ссылка
ее структуры в высоконапорном вращающемся потоке под гидромеханическим воздействием: обработка воды вибрационными частотными колебаниями под действием внешнего давления.	активированной воды» (УПАВ) ООО «Озерский приборный завод».	месяцев, ОВП=-163мВ (исх.+86мВ), рН=9,22 (исх. 7,98), содержание солей 95 мг/л (исх. 155 мг/л), изменение токов проводимости 6,5-7,0 мкА.	
Активация воды путем ее распыливания, сопровождающегося изменением наноструктурного состояния воды в каплях диаметром от 40 до 10 мкм и менее. При работе распылителя на воду действуют одновременно несколько факторов: высокоамплитудные пульсации ядра вихря, турбулентность в потоке с интенсивностью 80%, объемная вихревая кавитация, самопроизвольное эжектирование воздуха в область ядра вихря.	Душ-массажный аппарат содержит соединенный с водопроводной сетью корпус, завихритель и вихревую камеру, установленные в корпусе.	Повышение рН на 0,18 ед., снижение ОВП на 9,6мВ, поверхностное натяжение воды остается неизменным.	[52]
Активация питьевой воды непосредственно перед употреблением с помощью перемешивающего устройства выполненного в виде керамической линзы с держателем. Керамический материал передает воде положительную информацию, перемешивающие движения сообщают воде кинетическую энергию в виде пульсирующих волн.	Активатор питьевой воды «3Quellen Pulsator» (Германия)	В процессе активации происходит «оживление» воды. Вода становится приятной на вкус.	[124]
Электромагнитная активация воды			
Активация воды с помощью обработки силовыми полями. Под	Устройство для доочистки питьевой воды «Аквадиск». Представляет собой полый диск из	Содержание общего железа уменьшается в 3-5 раз, аммонийного азота - в 3 раза,	[38]

Принцип создания, механизм эффекта	Прибор	Физико-химические характеристики полученной воды	Ссылка
возмущающим воздействием Аквадиска перераспределение потенциала в объеме воды приводит к изменению кинетики химических реакций, что, в свою очередь, приводит систему «Аквадиск – объем воды» в состояние динамического равновесия а химический состав воды – к соответствию нормам ПДК.	дерева, в полости которого размещены носитель информации (хвойная смола), постоянный магнит и спиралевидная катушка индуктивности.	активного хлора и сероводорода - в 2 раза, содержание кальция и органических кислот не изменяется	
Получение намагниченной жидкости при обработке жидкости низкочастотным магнитным полем и использование ее для опосредованного намагничивания другой жидкости.	Повышение индукционного потенциала жидкости в электромагнитном устройстве, содержащем соленоид, питающийся переменным током от низкочастотного генератора и создающий низкочастотное магнитное поле.	Происходит изменение кривой температурной зависимости изменения спектрального положения максимума ИК полосы поглощения (5180 см^{-1}) водосодержащих растворов при внесении даже малого количества намагниченной жидкости.	[58]
Воздействие на жидкость продольными электромагнитными волнами, акустическими волнами доультразвуковых и ультразвуковых частот.	Устройство для реализации предлагаемого способа состоит из смотанного в бухту шланга (в отверстие в середине бухты устанавливается сосуд с обрабатываемой жидкостью или трубопровод), электронасоса, платформы и соединительных шлангов.	Изменения водородного показателя и электропроводности: до обработки: $\text{pH}=5,51$, электропроводность= 168 мкСм/см ; после обработки: $\text{pH}=6,40$, электропроводность= 145 мкСм/см .	[8]
Воздействие на воду ультрафиолетового излучения для повышения эффективности воздействия воды на биологические структуры (замачивание семян для увеличения всхожести, замачивание кормов для увеличения надоев)	Жидкость помещают в сосуд и воздействуют на нее ультрафиолетовым излучением с плотностью потока мощности на поверхности не менее $0,4\text{ Вт/см}^2$.	Поверхностное натяжение воды увеличивается в 3 раза по сравнению с исходным ($70-76 \times 10^3\text{ н/м}$)	[34]
Биорезонансная активация красным поляризованным светом ($\lambda = 650\text{ нм}$).	Аппарат биорезонансной активации воды БМ-2М предназначен для обработки воды монохроматическим красным поляризованным светом гелий-неонового источника с длиной волны 650 нм .	После обработки не происходит изменение химического состава исходной воды, активация не влияет на жизнеспособность аутохтонной микрофлоры исходной воды.	[63]

Принцип создания, механизм эффекта	Прибор	Физико-химические характеристики полученной воды	Ссылка
Химическая активация воды			
Насыщение воды водородом. Растворение молекулярного водорода в воде ведет к увеличению рН и резкому уменьшению окислительно-восстановительного потенциала.	Устройство для получения жидкой среды, насыщенной водородом, находящимся под давлением, содержит емкость для соединения жидкой среды с водородом, источник водорода, средства для подвода газообразного водорода и жидкой среды.	Окислительно-восстановительный потенциал воды, насыщенной водородом, достигает минус (500 ÷ 700) мВ. Время установления потенциала составляет примерно 24 часа.	[76-78]
Насыщение (пересыщение) воды кислородом в результате смешивания исходной воды с кислородсодержащей парогазовой смесью, синтезированной плазмохимотронным методом.	Устройство для получения кислородсодержащей парогазовой смеси с помощью химотронной плазмы получаемой в плазмохимотроне при разности потенциалов 140 и 220В. Парогазовая смесь состоит из комплексных газожидкостных соединений кислорода, водорода и воды. Далее полученная смесь вводится в питьевую воду с помощью эжектора. Данное устройство используется при производстве бутилированных кислородсодержащих питьевых вод с торговыми марками «Супервода – O ₂ », «ОКСИ»	Концентрация растворенного кислорода в воде в пересыщенном состоянии при нормальных условиях 10-40 мг/л	[37]

Приложение Б

Биологические эффекты активированных вод

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
<u>Неконтактная электрохимическая активация:</u> Католит дистиллированной воды (ОВП=-270...-400мВ)	Нет данных	(+) ⁹ Пекарские дрожжи Saccharomyces cerevisiae (суспензия клеток в воде 1г на 1л): метод прижизненного знакопеременного клеточного микроэлектрофореза (измерение амплитуды колебания клеток в поле зрения микроскопа). Уменьшение коэффициента вариации амплитуды	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	[50]

⁹ здесь и далее - эффект в трактовке авторов цитированного исследования: положительный эффект (+), отрицательный эффект (-), (±) – при разной экспозиции получены противоположные данные

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
		колебания клеток на 5-17% по сравнению с суспензией в неактивирован- ном дистилляте, что указывает на повышение адаптивности клеток.						
<u>Неконтактная электрохимическая активация:</u> Неконтактно активированные на установке «Изумруд- СИ» (модель 4) инфузионные растворы с отрицательным ОВП без изменения химического состава.	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	(+) Онкобольные после радикальных операций на желудочно- кишечном тракте: изучены изменения показателей диастазы мочи и отделяемого из дренажей у 314 больных. Частота осложнений послеопераци- онного панкреатита	[116]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
							уменьшилась с 71% в контрольной группе до 26% в группе с применением бесконтактно- активирован- ных инфузионных растворов.	
<u>Контактная электрохимическая активация:</u> Католит (ОВП=-600мВ, рН=10) и его разбавленные растворы на водопроводной воде.	Нет данных	Нет данных	(+) Католит и его разбавленные растворы не оказали острого токсического действия на жизнеспособность дафний	(±) Водоросль Сценедесмус четыреххвост-ный :при экспозиции в 2-8% католите - стимуляция роста на 27%, в 30-50% католите - снижение прироста клеток по сравнению с контролем	Нет данных	Нет данных	Нет данных	[4, 5]
<u>Контактная электрохимическая активация:</u> католит	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	(+) Крысы и	Нет данных	Нет данных	[92]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
(pH=9,2±0,5; ОВП=-615±55мВ), анолит (pH=6,9±0,5; ОВП=+720±15мВ)					кролики - острая токсичность не выявлена			
<u>Контактная электрохимическая активация:</u> Католит (ЭВР-К), анолит (ЭВР-А).	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	(±) Эксперимент 1,3,6 суток при приеме ad libitum: здоровые крысы –нет изменений водно-солевого обмена и функции почек. У крыс с аллоксановым диабетом анолит способствует задержке развития заболевания (более низкие концентрации глюкозы в крови). Регенерирующее действие	Нет данных	Нет данных	[22]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
					католита на почки не выявлено, прием анолита на фоне диабета приводит к минимальным структурным изменениям поджелудоч- ной железы по сравнению с католитом.			
<u>Контактная электрохимическая активация:</u> католит 0,1% водного раствора хлористого натрия (ОВП=60 мВ)	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	(+) Кролики: через 48 часов выпаивания - активация ферментов антиокси- дантной системы, в гемолизате эритроцитов в первые 5 минут - стимулирова- ние активности	Нет данных	Нет данных	[70]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
					СОД, далее чувствитель- ность фермента снижалась			
<u>Контактная электрохимическая активация:</u> анолит (рН=7,0, ОВП=+900мВ), полученный на установке «СТЭЛ»	Нет данных	(+) Бактерицидное действие: полевые штаммы (E.Coli, Proteus vulgaris, P.mirabilis, Salmonella Dublin, S.enteritidis, Morganella morganii, Ps.aeruginosa) Экспозиция 1,3,5,7,10 минут – гибель всех бактерий через 7 минут.	Нет данных	Нет данных	(+) Безвредность анолита при выпаивании телятам первых дней жизни (по 300-400 мл на прием в течение двух дней) – в течение трех дней после приема – нет отклонений в клиническом состоянии. 19 телят,боль-ных диареей принимали анолит 2 раза в сутки по 300мл в течение 2-х дней – полное выздоровле-ние	Нет данных	Нет данных	[49]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
					(прекращение поноса, восстановление аппетита, улучшение общего состояния).			
Контактная электрохимическая активация: католит (pH 9,2±0,5, ОВП=-615±55 мВ), анолит (pH 6,9±0,5, ОВП=+720±15 мВ) водопроводной воды	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	(±) При различных способах введения крысам в течение 30 суток – католит и анолит не оказывали токсического действия. При длительном питье происходит увеличение массы тела у самцов с 4 по 9 неделю, анолит вызывает повышение индекса плодовитости	Нет данных	Нет данных	[17]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
					на 33,3% и индекса беременности на 31%. Введение ad libitum католита и анолита в течение 3-х половых циклов не влияет на репродуктивную функцию и беременность, не оказывает эмбриотоксического действия. При приеме самками католита и анолита 3 цикла до беременности, во время беременности и во время кормления вызывает у потомства снижение			

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
					темпов прироста массы и длины тела, отставание физического развития, усиление тормозных процессов у их крысят в 2-х месячном возрасте.			
Контактная электрохимическая активация: католит (pH= 11,5-11,0) и анолит (pH =2,5-3,5) водопроводной воды.	Нет данных	(±) При действии анолита возбудители эшерихиоза и сальмонеллеза погибают через 30 минут контакта in vitro. Добавление католита в количестве 4-5% стимулирует рост эшерихий и сальмонелл, стимулирует процесс дрожжевания	Нет данных	Нет данных	(+) Белым мышам per os вводили смертельную дозу культур E.Coli и S.typhimurium в объеме 1мл. 1-я группа - через 1 час – анолит внутрибрюшинно (погибли в течение 2-3 дней), 2-ой группе – 1мл анолита per os	Нет данных	Нет данных	[79]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
		кормов			(все выжили). Не обнаружено токсического действия на мышей (разовое введение 1 мл католита и анолита), белых крыс и поросят (2, 20мг/кг массы тела ежедневно в течение 21 дня). Назначение внутри анолита предупреж- дает развитие эшерихиоз- ной и сальмонелл- лезной септицемии. Внутрибрю- шинное применение анолита тормозит процессы перекисного			

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
					окисления липидов. Лечение эшерихиоза и сальмонелл- леза с помощью приема внутри анолита и католита в 1,5-2 раза эффективнее, чем традиционная терапия			
Контактная электрохимическая активация: католит (pH=7,8-8,7, ОВП=-680- 720мВ) и анолит (pH=5,8-6,2, ОВП=+750-920мВ) водопроводной воды, полученные на установке «СТЭЛ-40»	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	(+) Комбинирован- ное использование анолита и католита (местно и внутри) для лечения больных с гнойно- воспалительны ми процессами после хирургического вмешательства позволяет	[28]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
							быстро санировать гнойную рану, уменьшить интоксикацию, стимулировать образование грануляцион- ной ткани (на седьмой день лечения количество фибробластов в 5 раз больше, чем при стандартном комплексном лечении). При комплексном использовании местно и внутрь католита и анолита выявлено сокращение антибиотико- терапии на 65%, аллергических осложнений с 1,4 до 0,15%	
<u>Контактная электрохимическая активация:</u> Католит	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	(+) Мыши с генетическим	Нет данных	Нет данных	[151]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
водопроводной воды (pH=10,24±0,03; ОВП=- 400±17,3мВ), полученный в электролизере АК-3000 (Nexus, Корея)					диабетом (db/db) и без диабета (db/-): 4-х недельный эксперимент (эксперимен- тальная вода ad libitum, ночью – внутрибрюши нное введение глюкозы 1г/кг). При употреблении католита происходит снижение уровня глюкозы в крови на 41%, повышение инсулина в 2 раза по сравнению с контролем, уменьшение потери островных клеток.			
Контактная электрохимическая активация: католит с	(+) в тесте на индукцию хромосомных	(+) в тесте Эймса на штаммах	Нет данных	Нет данных	(+) Внутрижелу- дочные	Нет данных	Нет данных	[166]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
нейтральным pH (ОВП=-80-150мВ, концентрация растворенного водорода 0,9-1,14мг/л)	аберраций в культуре фибробластов легких китайского хомячка при 6-часовой и 24- часовой экспозиции мутагенная активность не обнаружена	Salmonella Typhimurium TA100, TA1535, TA98, TA1537 и штамме Escherichia WP2uvrA мутагенная активность не обнаружена			вливания католита крысам 20мл/кг массы тела в течение 28 дней – токсичности не обнаружено (биохимия крови, анализ мочи, клинические симптомы, гистология)			
<u>Контактная электрохимическая активация:</u> католит с pH=9,8	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	(+) Пациенты, перенесшие хронический гемодиализ получали католит в течение 6 месяцев. Прием католита приводил к улучшению цитокинового профиля, увеличению гематокрита (без увеличения	[146]

[illegible]

[illegible]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
	АФК, глюкозостимулиро- ванное увеличение уровня АТФ, стимулирование выработки инсулина в клетках.							
<u>Контактная электрохимическая активация:</u> католит сверхчистой воды, содержащей 2мМ NaOH (рН=11,6±0,1; концентрация водорода 0,4-0,9мг/л; содержание наночастиц платины 0,1-2,5х10 ⁻³ мг/л) и католит водопроводной воды, предварительно очищенной на угольном филт্রে (рН=9,6±0,2; концентрация водорода 0,2-0,5мг/л; содержание наночастиц платины 0-0,7х10 ⁻³ мг/л) полученные в электролизере на катоде с платиново-титановым покрытием при напряжении 100V в течение 60 минут.	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	(+) Нематоды Caenorhabditis elegans: увеличение продолжитель ности жизни в католите сверхчистой воды на 7- 41% и в католите водопровод- ной воды на 30% по сравнению с необработан- ными водами. Католиты снижают уровень накопления нематодами АФК.	Нет данных	Нет данных	[181]

[illegible]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
<u>Контактная электрохимическая активация:</u> изотонические растворы NaCl (0,8%), приготовленные на католите водопроводной воды (pH=7,5-8; ОВП=0-100мВ)	(±) Эритроциты крови человека – инкубация 24 часа: значительная модификация гемоглобина, снижение показателя времени кислотного гемолиза до 2мин, устойчивость оболочек эритроцитов к осмотическому шоку не менее 60% (в контроле 50%)	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	[56, 81]
<u>Контактная электрохимическая активация:</u> католиты (ОВП=-400...-820мВ) анолит (ОВП=700мВ) и водопроводной воды, полученные на бездиафрагменном электроактиваторе ЭЛХА-038.	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	(±) Нелинейные белые крысы: 1. <u>Католит (ОВП=-400мВ)</u> внутрижелудочно по 2мл 3 раза в день в течение месяца: увеличение массы тела, гипертрофия ворсинок и углубление	Нет данных	Нет данных	[56,81]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
					крипт слизистой 12- перстной кишки, увеличение индекса мечения тимидином H ³ , активация тканевых ферментов, умеренное увеличение содержания фосфолипи- дов в тканях миокарда и печени. 2. <u>Католит</u> (ОВП=- 500...-820мВ) – обработка стандартных кожных ран: ускорение заживления ран, увеличение индекса мечения тимидином H ³ в зоне пролифера- ции,			

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
					ускорение миграции клеток эпидермиса в область раневого дефекта. 3. <u>Анолит</u> (ОВП= 700мВ) внутрибрю- шинно по 2 мл в день в течение 1 месяца: подавление на 24% активности ферментов в сыворотке крови, в экстрактах ткани миокарда и печени. Подавление окислитель- ного фосфолиро- вания.			
<u>Контактная электрохимическая активация:</u> католит и	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	(±) Мышей СВА облучали	Нет данных	Нет данных	[56, 81]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
анолит на основе низкоминерализован- ной воды					летальной дозой (DL ₉₅) рентгеновс- кого излучения. Выпаивание католитом и анолитом ad libitum: в контроле смертность 96%, при употреблении анолита в более короткие сроки смертность 100%, католита – 10%			
<u>Контактная электрохимическая активация:</u> католиты и анолиты питьевой воды с минерализацией до 0,7мг/л.	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	(±) Выпаивание цыплят- бройлеров: 1. <u>Католит</u> (pH=8-9, <u>ОВП=-225-</u> <u>530мВ</u>) – заметный прирост живой массы, увеличение	Нет данных	Нет данных	[56, 81]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
					содержания в печени витаминов А и В ₂ на 20,4 и 9,7%, повышение усвоения азота, жира, кальция, фосфора. 2. <u>Католит</u> (pH=9-12, ОВП=-550-700мВ) и <u>анолит</u> (pH=2-3, ОВП=850-950мВ) – резкое угнетение пищеварительных ферментов.			
<u>Контактная электрохимическая активация:</u> диализный раствор на основе католита деионизированной воды (pH=7,47, ОВП=-135...-170мВ)	(+) стимуляция подвижности сперматозоидов быка в диализном растворе на основе католита.	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	(+) 22 больных с хронической почечной недостаточностью, курс ацетатного диализа 2-3 месяца: снижение у	[56, 81]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
							больных, склонных к гипертензии, артериального давления на 30- 40 мм.рт.ст.; увеличение рН артериальной крови на 0,02- 0,05 ед., улучшение общего самочувствия, уменьшение водопотребле- ния, ослабление симптомов кожного дерматита.	
<u>Контактная электрохимическая активация:</u> Изотонический раствор католита на основе NaCl (ОВП=-800мВ)	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	(+) Влияние католита на показатели иммуногенеза у мышей СВА (однократно внутримы- шечно вводили взвесь эритроцитов крови барана	Нет данных	Нет данных	[56, 81]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
					в католите на основе NaCl): увеличение количества антител- образующих клеток в селезенке в 4- 6 раз, увеличение содержанияне насыщенных жирных кислот в клеточной оболочке спленоцитов на 15-30%, отсутствие признаков деструкции липидной фазы клеточных мембран спленоцитов.			
<u>Контактная электрохимическая активация</u> : 0,9% водный раствор хлористого натрия (NaCl) – католит и	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	(-) Кролики: однократное внутривенное введение из расчета 1,2,3	(+) Однократный прием per os (из расчета 1мл/кг массы тела) не вызывал значительных	Нет данных	[16]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
анолит					мг/кг дозозависимо повышало АД (измерение в течение часа с интервалом 10 минут). <u>Крысы:</u> 1.Однократ- ное внутрибрю- шинное введение католита при стрессовой ситуации повышает уровень АД; 2.Прием per os в течение месяца до опыта не оказывает нормализую- щего влияния на уровень АД в стрессовой ситуации	сдвигов в показателях АД и пульса (измерение через 30 минут после приема)		
<u>Контактная</u> <u>электрохимическая</u> <u>активация:</u> католит и	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	(+) <u>Католит:</u> системное	Нет данных	Нет данных	[27]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
анолит раствора NaCl (0,1-0,5%)					действие на организм (мышы, крысы, кошки, коровы, телята, перепелки, куры и цыплята): изменение электролитного состава сыворотки крови, увеличение резервной щелочности, содержания кальция, уменьшение количества лимфоцитов и увеличение количества плазмоцитов в слизистой оболочке кишечника, модуляция иммунного ответа, дифференциация клеток			

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
					лимфоидного ростка, резкое снижение количества эозинофилов и тучных клеток, увеличение числа макрофагов в сыворотки крови при введении антибиотиков. <u>Анолит</u> – использова- ние для дезинфекции помещений для животных, дезинфекция костного сырья и яичной скорлупы.			
<u>Контактная электрохимическая активация:</u> водные растворы хлорида натрия: католит (pH=9,2±0,5, ОВП=-	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	(+) Крысы, мыши (30 дней при различных способах введения): нет	Нет данных	(+) 34 пациента с мочекаменной болезнью: при включении католита в комплексное	[17]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
615±55мВ) и анолит (pH=6,9±0,5, ОВП=+720±15мВ)					токсического действия католита и анолита, обнаружено положительное действие на состояние водно-электролитного обмена и функциональную способность мочевыделительной системы при остром нефрите. При остром цистите выявлены положительные изменения показателей мочи у животных при приеме католита и анолита, анолит более интенсивно чем католит		лечение (1 мл/кг массы тела 3 раза в день 14 суток): происходит небольшое подщелачивание мочи, уменьшение выраженности боли и ускорение отхождения конкрементов. 30 пациентов (женщин) с циститом на фоне базовой терапии – инсталляции 20мл анолита в мочевого пузыря в течение 7 суток – уменьшение лейкоцитурии в 18 раз по сравнению с контрольными группами.	

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
					снижает количество лейкоцитов в моче.			
Контактная электрохимическая активация: 0,3% водные растворы хлорида натрия: католит (pH=8,2-9,5; ОВП=-450- 600мВ) и нейтральный анолит (pH=7,3-7,7; ОВП=+700-1100мВ)	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	(+) 10 здоровых крыс: при внутрисус- тавном введении 0,2мл анолита: отсутствие повреждаю- щего действия на ткани суставов. 90 крыс с гнойным артритом: внутрисус- тавное введение анолита и прием ad libitum католита в течение 7 дней. Анолит оказывает противовос- палительное	Нет данных	(+) 86 больных с гнойными артритами (эксперимент 7- 12 дней): 1-я группа (43 человека) – медикаменты+ внутрисуставно 1% раствор диоксидина, 2-я группа (43 человека) – медикаменты+ внутрисуставно анолит (10- 500мл в сутки) и прием внутрь католита 3 раза в день по 100- 200 мл. Во второй группе выраженный бактерицидный эффект в первые три дня лечения, сокращение	[86]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
					действие, католит усиливает репарацион- ные процессы в воспаленных тканях сустава.		длительности антибиотикотер- апии на 50%, сокращение срока иммобилизации сустава на 7-10 дней..	
<u>Контактная электрохимическая активация:</u> электроактивированные водные растворы (ЭАВР): католит на основе гидрокарбоната натрия (ОВП=-480- 520мВ, рН=8,2-9,3), анолит на основе хлорида натрия (ОВП=+700+750мВ, рН=6,6-7,2)	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	(+) крысы в течение 30 дней ad libitum католит и анолит: нет отрицатель- ного воздействия на слизистую оболочку полости рта	Нет данных	(+) Больные с хроническим генерализован- ным пародонтитом: эффективность применения ЭАВР совместно с общей терапией и без. При использовании ЭАВР – улучшение показателей через 6 месяцев после окончания лечения.	[1]
Водопроводная вода, обработанная сверхслабым (индукция 5*10 ⁻⁶ Тл)	Нет данных	(+) 10-20- кратный	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	[57]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
электромагнитным полем низкой частоты (4 Гц) напрямую и опосредованно		бактерицидный эффект (угнетение роста) в отношении St.aureus при экспозиции 180 минут по сравнению с контрольной необработанной водой						
Активация воды силовыми полями - Прибор Аквадиск (полый диск из дерева в полости которого размещены носитель информации (хвойная смола), постоянный магнит и спиралевидная катушка индуктивности)	Нет данных	(+) снижение микробного числа и отсутствие патогенных бактерий в воде	Нет данных	Нет данных	Нет данных	(+) улучшение биохимических показателей ротовой полости, оптических сред левого глаза, улучшение психоэмоцио- нального состояния	Нет данных	[21, 75]
Активация воды УФ излучением с плотностью потока мощности на поверхности жидкости	Нет данных	Нет данных	Нет данных	(+) увеличение всхожести семян при замачивании	Нет данных	Нет данных	Нет данных	[34]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл-ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро-бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
не менее 0,4 Вт/см ² и временем экспозиции не менее 1 мин. При толщине слоя жидкости не более 1 см.				на 26%				
Московская водопроводная вода, прошедшая обработку прибором Й.Грандера. Устройство для активации воды И.Грандера (Австрия) – «оживитель воды» - проточный прибор из нержавеющей стали, имеющий внутри себя отсеки, заполненные информационной водой Грандера. В процессе протекания через прибор «информация передается» водопроводной воде.	(+) Отсутствие токсического действия на сперму быка	(+) Снижение концентрации и срока жизни бактериальной микрофлоры воды (ОКБ, ТКБ, сальмонелл); воздействия на вирус полиомиелита и колифаги не выявлено; отсутствие токсического действия на бактерии «Эколюм»; снижение суммарной мутагенной активности водопроводной хлорированной питьевой воды	(+) Инфузории и дафнии - отсутствие острого токсического действия	(+) В разведении 1:1 не обнаружено угнетающего действия на корневую систему семян овса, при разведении 1:5 - ускорение роста корней и увеличение всхожести семян.	(+) Белые мыши (14,30,45 дней) ad libitum – значимое увеличение водопотребления, нет влияния на состав крови, иммунореактивность.	(+) Волонтеры принимали в течение 5 дней по 200 мл. воды. Результат: значимое увеличение количества пациентов с положительным влиянием исследованной воды на состояние желудочно-кишечного тракта, повышение защитной функции слизистых носа и рта, снижение воспалительных реакций в этих органах.	Нет данных	[20, 35]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл-ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро-бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
		после прибора на штамме TA 100 без метаболической активации; На штамме TA 98 – эффекта нет						
Артезианская вода источника «Стефания», прошедшая обработку прибором Й.Грандера	(±) Лимфоциты крови человека, культивируемые в условиях цитокинетического блока: разнонаправленные эффекты для разных доноров (донор 1 – нет генотоксических эффектов, донор 2 – под действием стандартного мутагена – повышение двужадерных клеток с микроядрами, снижение частоты ускоренно делящихся клеток на фоне 3-х кратного увеличения частоты несимметричных 3-	(+) тест Эймса (Salmonella Typhimurium штаммы TA100 и TA98) – генотоксичность не обнаружена	(+) инфузории, дафнии, биосенсеры «Эколюм» - нет токсического действия	Нет данных	(+) <u>Белые мыши (14,30,45 дней) ad libitum</u> – значимое увеличение водопотребления, нет влияния на состав крови, иммунореактивность. <u>Иммунизированные белые мыши 3 месяца ad libitum</u> : стимулирующий эффект выработки LgG. <u>Крысы: ad libitum 6 месяцев</u> :	(+) Волонтеры принимали в течение 5 дней по 200 мл. воды. Результат: значимое увеличение количества пациентов с положительным влиянием исследованной воды на состояние желудочно-кишечного тракта, повышение защитной функции слизистых носа и рта, снижение воспалительных реакций в этих	Нет данных	[20, 44, 98, 121]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл-ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро-бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
	ядерных клеток и снижения уровня токсичности).				полиорган-ный микроядер-ный тест –нет генотокси-ческих эффектов в желудке, костном мозге и мочевом пузыре.	органах.		
Контактная и опосредованная обработка жидкости (воды и водных растворов) низкочастотным магнитным полем. Обработка (в течение 3 часов) происходит в электромагнитном устройстве, которое состоит из соленоида, питаемого переменным током низкочастотного генератора.	Нет данных	(+) бактерицидный эффект на бактерии E.Coli, St. aureus	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	[58]
А-вода - Извлечение из воды пограничного слоя на границе с поверхностью (высота	(+) Изучение токсичности сывороток КРС и ЭТС: при добавлении к сывороткам А-воды	Нет данных	Нет данных	Нет данных	(+) Увеличение выжива-	Нет данных	Нет данных	[80]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
пограничного слоя 300 мкм): подобран экспериментальный режим, позволяющий собирать данную воду в объеме.	(1:8) уменьшение токсичности, у 5 из 9 сывороток – улучшение морфологии здоровых клеток человека. У здоровых клеток нет изменений пролиферации и жизнеспособности, у раковых клеток – угнетение пролиферации. В культуре перевиваемых клеток человека – модулирование цитокинового ответа при инфицировании клеток вирусом гриппа и герпеса				емости мышей на 35-40% при лечении инфекций гриппа и герпеса			
Питьевая вода «Ренорм». Устройство для активации воды состоит из двух источников: акустического и электрического сигнала разной частоты, излучателя и усилителя. Сигналы от источников поступают на входы	Нет данных	(+) тест Эймса (Salmonella Typhimurium штаммы TA100 и TA98): генотоксичность не обнаружена	(+) инфузории, дафнии, биосенсоры «Эколюм» - нет токсического действия	Нет данных	(+) Крысы с асцитной гепатомой Зейделя-увеличение продолжительности жизни. <u>Иммунизированные белые мыши</u>	(+) 1.Нормализация гомеостаза макрофагов при исследовании цитологического статуса слизистых оболочек ротовой и носовой полости после	(+) 1.При приеме больными с ожирением и сердечно-сосудистыми заболеваниями на фоне базисной терапии и гипокалорий-	[14, 30-32, 98, 102]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
(разные края металлической пластины, полюса катушки индуктивности или громкоговорителя) излучателя через усилитель и излучаются в окружающее пространство, создавая электромагнитное и звуковое поле, под действием которого вода, находящаяся в этом поле, структурируется					– стимулирующий эффект выработки LgG (3 месяца). <u>Крысы</u> : потребление 6 месяцев ad libitum – полиорганный микроядерный тест –нет различий с контролем в желудке и костном мозге; снижение доли клеток с протрузиями и микроядрами в эпителиальных клетках мочевого пузыря.	потребления воды в течение 1 месяца. 2.Волонтеры принимали в течение 5 дней по 200 мл. воды: значимое увеличение количества пациентов с положительным влиянием исследованной воды на состояние желудочно-кишечного тракта, повышение защитной функции слизистых носа и рта, снижение воспалительных реакций в этих органах.	ной диеты в течение 3 недель – улучшение биохимического статуса. 2.Нормализация иммунного статуса онкологических больных при комбинированном лечении	
Биогенная вода «Туран». Вода добывается из подземного источника,	Нет данных	Нет данных	Нет данных	(±) Различное физиологическое действие	(±) <u>Крысы</u> : <u>(разовая водная</u>	(+) Учащиеся 2-6-х классов (827 детей) –	(+) При	[33, 63, 84, 85]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл-ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро-бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
проходит фильтр механической очистки и аппарат биорезонансной активации, где обрабатывается красным поляризованным светом ($\lambda = 650$ нм), перед розливом в бутылки озонируется.				на проростки озимой пшеницы: при экспозиции 1-4 мин – оптимальные условия для проростков, далее – снижение показателей роста	<u>нагрузка и в течение 14 суток методом зондирования в дозе 1% от массы тела):</u> Стимуляция функционального состояния почек (рост суточного диуреза, увеличение скорости фильтрации первичной мочи в клубочковом аппарате). Нет изменений функционального состояния печени и поджелудочной железы. Кровь через 2 недели: уменьшение лимфоцитов и увеличение	употребление воды в течение 6 месяцев: улучшение показателя качества жизни (стандартизированный опросник качества жизни PedsQL), снижение заболеваемости ОРВИ.	употреблении больными неврологического отделения -улучшение самочувствия, аппетита, нормализация деятельности головного мозга. При приеме 1-1,5л в день воды от 60 до 90 дней отмечено растворение и отхождение мелких конкрементов из почек, повышение уровня гемоглобина	

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
					нейтрофилов, лейкоциты – без изменений, в 2 раза увеличение гетерофиль- ных антител. <u>Крысы с моделью скрытого дефицита железа:</u> повышение белоксинте- зирующей функции печени, нормализация окислительно -восстанови- тельных процессов, ухудшение состояния энергообмена в миокарде (анаэробиз).			
Гелиопротекторная вода «Аквагелиос». Обработка артезианской воды в сосуде из немагнитного	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	(+) Волонтеры в возрасте от 21 до 80 лет: состояние	Нет данных	[23, 24]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
материала в течение не менее 5 часов в рабочем пространстве экранирующего устройства для ослабления полного вектора геомагнитного поля не менее, чем в 300 раз, в сравнении с фоном. Полученный «концентрат гелио-протекторной воды» вносится в воду в соотношениях 1:10000 и 1:5000.						систем организма оценивалось на программном комплексе «Здоровье-Экспересс» по спектру сердечного ритма (2-х минутная регистрация ЭКГ-сигнала при контакте руки обследуемого с бутылкой исследуемой воды). С помощью таблиц для экзогенной биорезонансной терапии частотами Пауля-Шмидта. По амплитуде экстремумов определялась величина активности систем организма. По результатам		

[illegible]

[illegible]

Наименование воды, принцип создания	Эффект							Ссыл- ка
	клетки животных и человека in vitro	бактерии	гидро- бионты	растения	животные in vivo	человек		
						здоровый	больной	
	условиях цитокинетического блока: снижение пролиферации, увеличение чувствительности к стандартному мутагену, увеличение частоты ускоренно делящихся клеток с повреждениями (250 ppm), двуядерных клеток с повреждениями (1000 ppm)							

Приложение В

**Межведомственный научный совет
по экологии человека и гигиене окружающей среды
Российской Федерации**

1.1. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПИТЬЕВЫХ ВОД С ИЗМЕНЕННЫМИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

**Методические рекомендации
МР**

Издание официальное

МОСКВА, 2015

«УТВЕРЖДАЮ»

Председатель проблемной комиссии
Межведомственного Научного совета
по экологии человека
и гигиене окружающей среды
Российской Федерации
академик РАН Ю.А.Рахманин

«_15_»_января____2015

1.1. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПИТЬЕВЫХ ВОД С ИЗМЕНЕННЫМИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

**Методические рекомендации
МР**

Издание официальное

МОСКВА, 2015

Анализ генетической безопасности питьевых вод с измененными физико-химическими свойствами

Методические рекомендации разработаны в ФГБУ «НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н.Сысина» МЗ РФ (директор – академик РАН Ю.А.Рахманин) д.б.н. Ф.И.Ингель, к.м.н. В.В.Юрченко, О.В.Зацепиной

Рекомендации предназначены для служб здравоохранения и Роспотребнадзора, занимающихся оценкой безопасности питьевых вод.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	5
Назначение и область применения методики.....	5
1. Оценка показателей нестабильности генома на культуре клеток крови человека.....	6
1.1. Термины и определения.....	6
1.2. Проведение исследования.....	8
1.3. Фиксация клеток.....	9
1.4. Цитогенетический анализ.....	10
1.5. Протокол результатов оценки нестабильности генома в тесте на индукцию микроядер в лимфоцитах крови человека, культивированных в условиях цитокинетического блока	15
2. Анализ влияния активированных вод на индукцию доминантных летальных мутаций в половых клетках дрозофилы.....	15
2.1. Термины и определения.....	16
2.2. Постановка эксперимента и анализ результатов.....	17
2.3. Протокол результатов оценки генотоксической активности воды в тесте на индукцию доминантных летальных мутаций в половых клетках самцов <i>Drosophila melanogaster</i>	19
3. Оценка частоты aberrаций хромосом в клетках костного мозга мышей..	19
3.1. Термины и определения.....	20
3.2. Животные.....	21
3.3. Цитогенетический анализ.....	22
3.4. Микроскопический анализ.....	23
3.5. Оценка результатов.....	23
3.6. Протокол результатов оценки цитогенетической активности в тесте на индукцию хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей.....	25
4. Алгоритм изучения генотоксических эффектов активированных вод.....	25
Литература.....	26
Микрофотографии.....	29

ВВЕДЕНИЕ

Проблема качества питьевой воды на современном этапе развития цивилизации является ключевой, поскольку непосредственно связана с состоянием здоровья ныне живущих людей и будущих поколений. Известно, что качество питьевой воды определяется не только ее химическим составом, содержанием микрофлоры и пр., но и физико-химическими свойствами. [5, 13, 14]. Поэтому в настоящее время широкое распространение получили разнообразные технологии водоподготовки, в результате которых заметно изменяются именно физико-химических свойства питьевой воды. В то же время в литературе накапливаются сведения о том, что эти изменения оказывают влияние на процессы формирования, стабилизации и функционирования клеточных мембран, а также белков и ДНК [1]. Эти данные позволяют предположить наличие у активированных вод генотоксической активности, что выводит на передний план гигиенических исследований экспериментальную оценку отдаленных эффектов активированных вод.

Бесконтрольная продажа и пропаганда использования в быту активированных питьевых вод и приборов для их получения делает проблему оценки их генетической безопасности особенно актуальной.

НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДИКИ

Цель исследования – выявление и количественная оценка генотоксических эффектов активированных питьевых вод с измененными физико-химическими свойствами.

В основе рекомендуемого 2-этапного подхода лежит системный анализ эффектов нестабильности генома в соматических и половых клетках живых организмов, находящихся на разных уровнях организации живого – дрозофилы, мышей и лимфоцитов крови человека. Предлагаемая схема исследования может быть использована не только для оценки генетической безопасности активированных вод, но также новых технологий водоподготовки и

оборудования для их реализации.

1. ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Микроядерный тест *in vitro* основан на культивировании лимфоцитов или цельной венозной крови человека и/или животных в присутствии цитохалазина В, создающего условия для блока цитокинеза, и позволяет определить спонтанные и индуцированные эффекты нестабильности генома, проявляющиеся как изменение митотической и пролиферативной активности клеток, возникновение генетических повреждений, асимметричное распределение генетического материала во время митоза и апоптоз [9, 19].

Принцип рекомендуемого метода заключается в культивировании клеток в реконструированных средах, приготовленных разведением стандартной сухой среды изучаемыми активированными водами. В этом случае изучаемая вода становится основой культуральной среды, и ее действие на клетки может проявиться максимально полно.

1.1. Термины и определения

Апоптоз - процесс генетически запрограммированной гибели клетки.

Анеуплоидия - особый класс геномных мутаций, приводящих к неравновесному распределению генетического материала между дочерними клетками (или ядрами), изменение численного состава хромосом, характерных для клеток биологического вида; при культивировании клеток в условиях цитокинетического блока анеуплоидия проявляется как образование клеток с нечетным числом ядер, относят к разряду мутаций.

Микроядро – хроматиновая структура, находящаяся в цитоплазме строго отдельно от основного ядра (ядер) эукариотической клетки; микроядро диаметр микроядра не превышает 1/3 диаметра основных ядер; образуется из ацентрических фрагментов хромосом или целых хромосом, отставших от веретена деления на стадии анафазы; Микроядро может наблюдаться в клетках

любых тканей. Следует отличать от фрагментов ядер, образовавшихся в результате апоптоза и поглощенных живой клеткой в процессе фагоцитоза.

Митоз - деление ядра эукариотической клетки с сохранением числа хромосом

Митотический индекс – одна из характеристик пролиферативной активности, оценивается как количество клеток в фазе митоза, определенное при подсчете 500 или 1000 клеток.

Нестабильность генома – термин для описания феномена, маркеров и совокупности механизмов множественных изменений, приводящих к трансформации стабильного генома нормальной клетки в нестабильный - характерный для опухоли [22].

Нуклеоплазменный мост – хроматиновая структура, образующаяся в анафазе митоза клетки, содержащей хромосому с двумя или более центромерами. Центромеры таких хромосом расходятся к разным полюсам, формируя хромосомный мост, который может в дальнейшем разрываться с образованием микроядер или ядерных протрузий. Может также формироваться из цепочки хромосом, не включенных в веретено деления.

Пролиферация – деление (размножение) клеток – увеличение числа клеток (в ткани, культуре), происходящее путем митотических делений.

Ускоренно делящиеся клетки – клетки, прошедшие более 1 деления за время культивирования – содержат более 2 ядер.

Цитокинетический блок – образование ковалентной связи между молекулами блокатора (напр., цитохалазинов) и оперенным (быстро растущим) концом актинового филамента, что практически полностью блокирует как дальнейший рост, так и деградацию филамента на этом конце нити. В результате возникает блок цитокинеза за счет разрушения образующегося фрагмента, что не препятствует процессам репарации и репликации ДНК.

1.2. Проведение исследования

Венозную кровь молодого здорового некурящего донора (2-5 мл) отбирают в гепаринизированные (5000 МЕ/мл) одноразовые шприцы или вакутенеры (вакуумные пробирки) с гепарином, которые после смены иглы хранят в холодильнике в течение суток.

Реконструированные среды для культивирования готовят следующим образом [4]: в стандартную навеску сухой среды RPMI-1640 (ПанЭко, РФ), рассчитанную на приготовление 2,0 л жидкой среды, добавляют стерильный раствор 7,5% бикарбоната натрия до конечной концентрации 1500 мг/л – в соответствии с прописью фирмы. Этот раствор используют в качестве базового для приготовления всех реконструированных сред.

Для изучения эффектов нестабильности генома, индуцированных изучаемыми водами, 80 мкл этого раствора доводят тестируемой водой до 3,0 мл.

Состав реконструированной среды:

1. 3,0 мл среды, приготовленной на изучаемой воде
2. 0,8 мл инактивированной сыворотки крупного рогатого скота
3. 0,2 мл цельной венозной крови
4. 30 мкл ФГА (1,0 мг/мл) в стерильном физиологическом растворе
5. 10 ЕД/мл смеси пенициллина со стрептомицином, приготовленной на стерильном физиологическом растворе.

Клетки культивируют при 37 °С в стеклянных пенициллиновых флаконах объемом 10 мл. в течение 72 час. На 44 часу от начала культивирования во все культуры добавляют раствор цитохалазина В (ПанЭко, РФ) ДМСО до конечной концентрации 3-6 мкг/мл.

При параллельном анализе нескольких энергоинформационных вод культуры располагают в термостатах таким образом, чтобы исключить энергоинформационное влияние воды одной культуры на другие.

Контроли

При проведении исследований используют два негативных контроля:

1. стандартную жидкую среду RPMI-1640 (например, производства фирмы ПанЭко, РФ или аналог);
2. реконструированную среду, приготовленную на изучаемой неактивированной воде.

Позитивный контроль – водный раствор стандартного мутагена (например, митамицин С в концентрации 3 мкг/л), который добавляют на 24 часу от начала культивирования во флаконы с реконструированными средами и флаконы со стандартной средой.

1.3. Фиксация клеток

Фиксацию клеток проводят строго на 72 часу от начала культивирования. Для этого клетки переносят в стеклянные конические центрифужные пробирки объемом 10 мл и центрифугируют 10 мин на бакет-роторе со скоростью 1000 об/ми. Надосадок отсасывают с помощью водоструйного насоса. Осадок осторожно взбалтывают мягкими ударами пальца о пробирку и в эту пробирку приливают 5 мл холодного раствора хлорида калия (0,93 г/ 100 мл). Пробирку закрывают пробкой и мягко поворачивают вокруг оси в течение 40-45 сек. После этого в пробирку аккуратно по стенке приливают 1,0 мл холодного фиксатора (метанол : ледяная уксусная кислота 3:1 v/v), закрывают пробкой, несколько раз аккуратно переворачивают и ставят в холодильник не менее чем на 20 мин. Затем пробирку центрифугируют на скорости 1000 об/мин, надосадок отсасывают, осадок аккуратно разбивают ударами пальца, в эту суспензию по стенке приливают 5,0 мл холодного фиксатора и снова оставляют в холодильнике. Не менее чем через 20 мин всю процедуру смены фиксатора повторяют еще раз, после чего клетки оставляют в свежей порции фиксатора на ночь в холодильнике. Последнюю смену фиксатора проводят на следующий день, после чего клетки суспендируют в 0,5 мл холодного фиксатора, тщательно пипетируют и по 5-7 капель наносят на холодные (морозильная камера) предметные стекла. Препараты сушат на воздухе, окрашивают красителем

Романовского (ПанЭко, РФ) и шифруют. Возможна окраска с использованием флуоресцентных красителей [21].

1.4. Цитогенетический анализ

Метод позволяет анализировать группы показателей, связанных с пролиферацией клеток крови (микрофото 1-13), повреждением генома (микрофото 14-29) и запрограммированной гибелью клеток – апоптозом (микрофото 30-33).

Цитогенетический анализ [6, 23] проводят с помощью светового микроскопа в проходящем свете при увеличении 10 x 100 (масляная иммерсия, матовый светофильтр).

Для анализа на препаратах выбирают поля зрения, на которых все клетки лежат отдельно, имеют цитоплазму с четкой границей, и в каждой клетке можно подсчитать количество ядер и определить ядерные аномалии. Все поля зрения, не соответствующие этим критериям, пропускают. Клетки без цитоплазмы не учитывают.

Микроядра учитывают в клетках, в которых основные ядра лежат отдельно друг от друга и идентифицируют как лежащие в цитоплазме четко отдельные от ядер округлые хроматиновые тела с непрерывным гладким краем (микрофото 16, 17, 19, 20, 21, 22, 24-27, 29). **Микроядро типа «разбитое яйцо»** связано с основным ядром нуклеоплазменным мостиком (микрофото 15). **Нуклеоплазменный мост** учитывают, если его толщина не превышает 1/3 диаметра ядра (микрофото.7-10, 17-21, 23, 26, 28, 29). **Морфологические признаки апоптоза** (микрофото 30-33) проявляются в изменениях ядер, цитоплазмы и клеточной мембраны, причем эти признаки всегда обнаруживаются в отдельных клетках. К признакам апоптоза относятся плотные фрагменты хроматина (апоптотические тельца), находящиеся внутри клеточной мембраны. Хроматин конденсируется по периферии, под мембраной ядра, при этом образуются четко очерченные плотные массы различной формы и размеров. Ядро же может разрываться на два или несколько фрагментов

разной формы и размеров, но все они содержат конденсированный хроматин, в котором отсутствуют признаки структуры. При апоптозе также наблюдается изменения клеточной мембраны ("отшнуровывание" пузырьков, так называемых апоптотических телец), ядро меняет свои размеры, становится исчерченным, фрагментируется, ядерные поры концентрируются только в месте, где не происходит конденсация хроматина.

Микроскопический анализ (табл. 1) проводят следующим образом: при подсчете 500 клеток определяют спектр клеточных популяций: количество клеток в фазе митоза, клеток с 2, 3, 4 и более ядрами, учитывая повреждения (нуклеоплазменные мосты - НПМ и микроядра - МЯ) в них, а также клетки в состоянии апоптоза. После этого на других участках стекла учитывают только двуждерные клетки с четкой цитоплазмой и отдельно лежащими ядрами, в которых отмечают количество и тип МЯ, НПМ, а также клетки, в которых ядра находятся в разных стадиях клеточного цикла. В совокупности двух просмотров на каждом стекле насчитывают 1000 двуждерных клеток.

Такой анализ позволяет определять показатели, характеризующие:

- генотоксические эффекты: частоты 2-ядерных клеток с МЯ (отдельно с 1-, 2-, 3- и большим числом МЯ, а также клеток с МЯ типа «разбитое яйцо» и с НПМ), частоты 3-ядерных клеток с микроядрами и с НПМ, частоты 4-ядерных клеток с МЯ и с НПМ, частоты полиядерных клеток с микроядрами и с НПМ;

- пролиферативную активность клеток: спектр делящихся клеток, пролиферативный пул, индекс репликации ядер, индекс пролиферации, долю ускоренно делящихся клеток (имевших на момент фиксации более 2 ядер), долю асимметрично делящихся клеток во втором митозе (по соотношению частот клеток с 3 и 4 ядрами);

- митотический индекс,

- частоту апоптоза.

Микрофотографии основных типов клеток, определяемых в данном тесте, и генетических повреждений в них см. микрофотографии.

Дополнительно для каждой культуры рассчитывают:

- пролиферативный пул - как сумму клеток в состоянии митоза и клеток с 2-мя, 3-мя, 4-мя и большим числом ядер,
- долю (%) делящихся клеток (содержат более одного ядра) с генетическими повреждениями - микроядрами (МЯ) и нуклеоплазменными мостами (НПМ),
- объем фракции ускоренно делящихся клеток в спектре клеточных популяций - как сумму клеток, образовавшихся в результате 2 и большего числа митотических циклов (клеток с 3-, 4- и большим числом ядер) (%),
- объем фракции ускоренно делящихся клеток с генетическими повреждениями (микроядрами и нуклеоплазменными мостами) (%),
- степень асимметрии деления клеток во втором митотическом цикле – как соотношение частот 3-ядерных и 4-ядерных клеток;

Основными показателями цитотоксического действия считают индекс репликации, характеризующий процессы удвоения ДНК [24]:

$$ИР = [(1 \times \% \text{однойдерных кл}) + (2 \times \% \text{двухдерных кл}) + (3 \times \% \text{3-ядерных кл}) + (4 \times \% \text{4-ядерных кл})] / 100)$$

и индекс пролиферации [23]:

$$ИП = [(1 \times \% \text{однойдерных кл}) + (2 \times \% \text{двухдерных кл}) + \{3 \times \% \text{3-ядерных кл} + \% \text{4-ядерных клеток} + \% \text{полиядерных клеток}\}] / 100)$$

Основными показателями генотоксичности считают:

- частоту двухдерных клеток с повреждениями,
- частоту делящихся клеток с повреждениями,
- соотношение частот 3-х и 4-х ядерных клеток (степень асимметрии распределения генетического материала в клетках, прошедших 2-й митоз),

- частоту апоптоза,
- чувствительность к действию мутагена (эффект мутагена/спонтанный уровень), определенную по всем показателям.

Всего на каждом цитогенетическом препарате анализируют 1300-1500 клеток.

Статистическую обработку данных по всем параметрам в этом тесте проводят в стандартном пакете компьютерных программ Statistica Statsoft или аналогичной программе с использованием критерия X^2 [7].

Заключение о наличии (отсутствии) влияния активированных вод на показатели нестабильности генома клеток крови человека делают по:

- результатам сравнения с негативным контролем по всем указанным параметрам;
- наличию и характеру зависимости эффекта от условий активации воды;
- коэффициентам β регрессионных уравнений, которые характеризуют нарастание эффекта на единицу воздействия (изменения продолжительности активации воды и ее физико-химических показателей).

Таблица 1. Протокол цитогенетического анализа в микроядерном тесте на культуре клеток крови человека

№ стекла Исследователь		Всего	Дата
Митоз			
Апоптоз			
Ядерность	1	клеток	
		с МЯ	
		клеток	
		Из них с НПМ	
	2	Из них с МЯ	
		1	
		2	
		3	
		>	
		разбитое яйцо»	
	3	клеток	
		Из них с НПМ	
		Из них с МЯ	
	4	клеток	
		Из них с НПМ	
		Из них с МЯ	
	5	клеток	
		Из них с НПМ	
		Из них с МЯ	
	6	клеток	
		Из них с НПМ	
		Из них с МЯ	
	7	клеток	
		Из них с НПМ	
		Из них с МЯ	
	8	клеток	
		Из них с НПМ	
		Из них с МЯ	

1.5. Протокол результатов оценки нестабильности генома в

**тесте на индукцию микроядер в лимфоцитах крови человека,
культивированных в условиях цитокинетического блока**

Вода (название, источник)

Прибор, условия активации.....

Физико-химические свойства воды.....

Состав реконструированной среды.....

Количество повторностей на один образец.....

Контроли.....:

Полученные результаты: (вода индуцирует / не индуцирует генотоксическую активность; прибор может/не может быть использован для активации воды в быту).

Дата проведения работы.....

Список цитированной литературы

Исполнители:

Дата сдачи отчета:

2. АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ АКТИВИРОВАННЫХ ВОД НА ИНДУКЦИЮ ДОМИНАНТНЫХ ЛЕТАЛЬНЫХ МУТАЦИЙ В ПОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ДРОЗОФИЛЫ

Тест на индукцию доминантных летальных мутаций в половых клетках самцов дрозофилы является аналогом соответствующего теста на лабораторных грызунах и обладает близкой чувствительностью [16]. Метод основан на учете генетических повреждений в сперматозоидах самцов-родителей, которые приводят к гибели на стадии яйца потомка, развивающегося из зиготы, оплодотворенной таким сперматозоидом. Высокая предсказательная сила теста обеспечивается не менее чем 60% уровнем гомологии с генами человека. Кроме того, в геноме дрозофилы имеются около 75% генов болезней человека и более 50% белков дрозофилы гомологичны белкам млекопитающих. Суть рекомендуемого подхода заключается в выпаивании самцов *Drosophila melanogaster* раствором сахарозы, приготовленном на изучаемых водах.

Тест обладает высокой чувствительностью, прост в исполнении, экономичен, обладает уникальной возможностью изучать эффекты на очень больших выборках эукариотических организмов (что выгодно отличает его от

большинства токсикологических тестов) и рекомендован для прогноза канцерогенов [10, 8, 25, 27].

Принцип рекомендуемого подхода заключается в выпаивании самцов *Drosophila melanogaster* раствором сахарозы, приготовленном на изучаемых водах.

2.1. Термины и определения

Доминантные летальные мутации (ДЛМ) – генетические повреждения, возникающие в спермиях и приводящие к смерти потомков первого поколения на стадии эмбриона. Причиной ДЛМ являются крупные хромосомные перестройки (делеции и другие), анеуплоидия и генные мутации.

Ранние эмбриональные летали (РЭЛ) – гибель эмбрионов на ранних стадиях развития за счет, в первую очередь, негенетических причин (физиологические нарушения или повреждения важных цитоплазматических структур), и только часть РЭЛ вызваны генетическими причинами.

Поздние эмбриональные летали (ПЭЛ) - мутации, возникающие на поздних стадиях развития эмбриона и приводящие его к гибели. Принято считать, что ПЭЛ отражают истинную частоту мутационных событий.

РЭЛ и ПЭЛ у дрозофилы определяют через двое суток после откладки яиц. РЭЛ имеют вид свежеотложенных яиц (в норме в этот период личинки уже вылупились). ПЭЛ выглядят как яйца разных оттенков желто-коричневого цвета, что вызвано аутолизом тканей эмбриона.

В экспериментах используют мух вида *Drosophila melanogaster* линии Д-32 или другую линию с низкой спонтанной мутабельностью (например, Canton S). Линии поддерживают в соответствии с рекомендациями [12].

Основным показателем теста является превышение частот ранней (РЭЛ) и поздней (ПЭЛ) гибели эмбрионов над контролем. Генотоксическую (мутагенную) активность активированной воды учитывают по превышению частоты ПЭЛ над контролем [8, 10, 25, 27]. Поскольку на возникновение РЭЛ

влияют не только мутационные события (в том числе утраты хромосом), но и некоторые токсические эффекты, такие как эффективность спаривания, повреждения сперматозоидов в результате неучитываемых физиологических изменений, этот важный показатель не может служить мерой генотоксического действия, а указывает на совокупность физиологических и генотоксических эффектов.

2.2. Постановка эксперимента и анализ результатов

Все исследования проводят в зашифрованном виде.

50-60 самцов мух линии Д-32, Canton S или другой линии с низкой спонтанной частотой доминантных летальных мутаций (возраст – 3-4 суток) мягко усыпляют эфиром, помещают в стеклянные тигли, в дно которого впаян стеклянный фильтр, после чего тигель зарывают поролоновой пробкой. После того, как все мухи выйдут из состояния наркоза, тигель помещают в посуду с изучаемой водой, содержащей 5% сахарозы таким образом, чтобы верхний мениск жидкости не был выше верхнего края стеклянного фильтра.

Продолжительность экспозиции – 36-72 часа (при гибели большинства самцов в течение 36 час. Постановку следует повторить, используя разведения изучаемой воды в воде дистиллированной).

После окончания экспозиции 50 самцов из каждого тигля переносят в колбы, где их массово в течение 6 часов скрещивают с молодыми (возраст 2-4 суток) девственными самками той же линии в соотношении 1 самец : 2 самки¹⁰. После скрещивания самок отсаживают в специальные домики из оргстекла для откладки яиц: двумя стенками каждого домика служит капроновая сеточка, а дном - сменные кюветы с «голодным» кормом [12]. Кюветы под домиками сменяют через каждые 12 часов. Яйца, отложенные за первые 12 часов, не анализируют, поскольку среди них может быть много неоплодотворенных. После смены кювет в каждой из них подсчитывают количество отложенных яиц

¹⁰ В том случае, если внешний вид самцов сразу после экспозиции свидетельствует об их истощении, мух можно на 12 часов отсадить в пробирки с плоским дном, содержащие полный корм (не более 30 мух в пробирку, маркировка пробирок должна сохранять шифр тиглей), после чего проводить скрещивание с самками как обычно.

и помещают во влажные камеры, представляющие собой плотно закрытые пластиковые коробочки, на дно которых наливается дистиллированная вода. Камеры на 48 час помещают в термостат (24°C).

После этого кюветы еще раз просматривают для учета неразвившихся яиц: яйца, не изменившие первоначального вида, регистрируют как РЭЛ, яйца, приобретавшие все оттенки желтой или коричневой окраски – как ПЭЛ. Результаты расшифровывают только после окончания анализа результатов всего эксперимента.

Эксперимент проводят в 4- 5 повторностях. Для расчета частот доминантных летальных мутаций определяют долю (%) погибших зигот среди всех отложенных яиц. Фертильность определяют в % по соотношению отложенных яиц в экспериментальной и контрольной группах.

Статистическую оценку результатов проводят для каждой группы отдельно путем сравнения между опытными и контрольными сериями по критерию соответствия χ^2 [7].

Заключение о наличии (отсутствии) влияния активированных вод на частоту доминантных летальных мутаций делают по:

- результатам сравнения с негативным контролем по всем указанным параметрам;
- наличию и характеру зависимости эффекта от условий активации воды;
- коэффициентам β регрессионных уравнений, которые характеризуют нарастание эффекта на единицу воздействия (изменения продолжительности активации воды и ее физико-химических показателей).

Таблица 2. Протокол анализа (для одной экспериментальной группы)

Дата, Исследователь	1 группа			2 группа		
Повторность	Отложено яиц	Из них РЭЛ	Из них ПЭЛ	Отложено яиц	Из них РЭЛ	Из них ПЭЛ
1						
2						
3						
4						
Всего						
%						
X²						
Фертильность самцов						

2.3. Протокол результатов оценки генотоксической активности

воды в тесте на индукцию доминантных летальных мутаций в половых клетках самцов *Drosophila melanogaster*

Вода (название, источник, производитель)

Прибор, условия получения.....

Физико-химические свойства

Линия мух.....

Условия экспозиции, продолжительность.....

Контроли.....

Полученные результаты: (вода индуцирует / не индуцирует генотоксическую активность; прибор может/не может быть использован для активации воды в быту).

Дата проведения работы.....

Список цитированной литературы

Исполнители:

Дата сдачи отчета:

3. ОЦЕНКА ЧАСТОТЫ АББЕРАЦИЙ ХРОМОСОМ В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ

Хромосомные aberrации и события, с ними связанные, являются причиной многих генетических заболеваний человека. Их накопление в соматических клетках является одним из факторов, ответственных за возникновение опухолевых клеток и индукцию в организме процессов старения. Кроме того, мутации, проявляющиеся как aberrации хромосом, могут быть связаны с

изменениями в онкогенах и генах-супрессорах опухолей, что является еще одной из причин возникновения опухолей у лабораторных животных и человека [3,4, 15].

Костный мозг млекопитающих является наиболее широко используемой моделью для исследования мутагенной активности химических соединений *in vivo*. Это связано, во-первых, с тем, что клетки костного мозга имеют высокую пролиферативную активность и, во-вторых, простотой приготовления препаратов. Морфология хромосом большинства видов лабораторных животных хорошо изучена. В основе метода лежит регистрация видимых структурных нарушений хромосом в клетках на стадии метафазы.

Тест на индукцию хромосомных aberrаций, определяемых в клетках костного мозга лабораторных грызунов *in vivo*, хорошо разработан и рекомендован в России и странах ОЭСР [2] для оценки генетической безопасности химических соединений и их смесей (в том числе, лекарственных препаратов), физических факторов, включая радиацию, и других факторов окружающей среды.

Для реализации рекомендуемого подхода мышей выпаивают изучаемыми водами *ad libitum*.

3.1. Термины и определения

Аберрации хроматидного типа – структурные нарушения на уровне одной хроматиды, выявляемые как одиночные фрагменты или хроматидные обмены, возникают при повреждении хромосомы в фазе S и G₂, когда хромосома состоит из 2 нитей.

Аберрации хромосомного типа – структурные нарушения на уровне идентичных локусов обоих хроматид, выявляемые как парные фрагменты и хромосомные обмены, демонстрируют повреждение, возникшее на предсинтетической стадии (G₁-фаза), когда хромосома представляет собой однопонитевую структуру.

Ахроматические пробелы (гепы) – определяемые визуально нарушения целостности окраски хроматиды, не превышающие по размеру ее ширины и не сопровождающиеся сдвигом дистального участка относительно ее оси.

Митотический индекс - процент делящихся клеток (клеток в стадии профазы, метафазы и ана- телофазы) от общего числа проанализированных клеток.

Цитогенетическая активность – способность вещества вызывать структурные и численные хромосомные нарушения в соматических и/или зародышевых клетках.

Частота клеток с абберациями хромосом в клетках костного мозга у большинства линий лабораторных мышей и F1 гибридов составляет 1-2%.

3.2. Животные

В эксперименте используют конвенциональные молодые половозрелые животные 2-месячные самцы мышей F1 (СВАхС57В1/6) с массой тела 20-24 г. (6 особей в группе). Животные должны быть разведены специально и ранее не участвовать в исследованиях. Производитель должен предоставить данные (ветеринарное свидетельство) последнего контроля состояния здоровья животных и сертификат на партию мышей F1(СВАхС57В1/6) для проведения данного исследования.

Подбор животных в группы осуществляют методом «случайных чисел», используя в качестве критерия массу тела. Индивидуальное значение массы тела не должно отклоняться от среднего значения в группе более чем на 10%.

Мышей содержат в поликарбонатных клетках по 6 особей. В качестве подстила используют стерилизованные древесные опилки. Мышей содержат отдельно от других видов животных в индивидуальной комнате при температуре воздуха 18-22°C, относительной влажности 40-60% и естественно-искусственном освещении.

Рацион животных составляет стандартный гранулированный полнорационный комбикорм для лабораторных животных ПК-120 ГОСТ

Р 51849-2001 Р.5 (ООО «Лабораторкорм», Россия или аналог, либо другой стандартизированный корм), который они получают *ad libitum* в кормовое углубление клетки.

Ежедневно каждая группа животных должна получать *ad libitum* свежеприготовленные стандартным образом воды. Объем выпитой воды в каждой поилке фиксируют ежедневно в процессе ее смены в поилке.

Эвтаназию мышей осуществляют цервикальной дислокацией (или другим регламентированным способом) через 24 часа и через 5-8 суток после начала выпаивания.

3.3. Цитогенетический анализ

Цитогенетический анализ частоты aberrаций хромосом основан на регистрации видимых структурных нарушений хромосом в клетках, находящихся на стадии метафазы (протокол анализа показан в табл.3).

Для накопления клеток в стадии метафазы за 2-2,5 часа до эвтаназии мышам внутрибрюшинно вводят колхицин (0,025% рабочий раствор) по 0,01 мл/г массы животного. Костный мозг из бедренных костей только что забитых мышей быстро вымывают в центрифужную пробирку 1 мл гипотонического (0,555%) раствора KCl, прогретого до 37°C.

Пробирки с костным мозгом инкубируют 10 минут в присутствии KCl при 37°C, центрифугируют в течение 5 минут при 1000 об/мин на центрифуге ЦЛН. Надосадочную жидкость осторожно сливают, на осадок наслаивают 1 мл свежеприготовленного холодного фиксатора (3 части метанола и 1 часть ледяной уксусной кислоты) и помещают на 20 минут в холодильник. После этого, не взбалтывая осадок, фиксатор сливают, в пробирки добавляют новую порцию холодного фиксатора того же объема и выдерживают в холодильнике не менее 20 минут. Клетки в третьей порции свежего фиксатора оставляют в холодильнике на ночь. Затем пробирки центрифугируют 5 минут при 1000

об/мин на центрифуге ЦЛН, фиксатор сливают, осадок разбивают мягкими ударами пальца о пробирку и добавляют 0,5 мл фиксатора. Полученную суспензию аккуратно пипетируют и раскапывают на чистые влажные охлажденные предметные стекла, которые высушивают над пламенем спиртовки.

Препараты окрашивают азур-эозином по Романовскому и шифруют. Возможно использование флуоресцентных красителей и меток [21].

3.4. Микроскопический анализ

Метафазные пластинки не должны иметь наложений хромосом, степень конденсации которых должна позволять увидеть четкие структуры. Из-за технических манипуляций возможны потери хромосом в пластинке, поэтому для анализа хромосомных aberrаций обычно анализируется метафазная пластинка, содержащая 38 – 42 хромосомы.

Во всех группах анализируют по 100 метафазных пластинок на каждое животное. Для анализа отбирают метафазные пластинки правильной формы, с хорошим разбросом хромосом и модальным числом 40 ± 2 . Учитывают следующие типы aberrаций хромосом: фрагменты (одиночные и парные) и обмены. При наличии в клетке более пяти aberrаций ее классифицируют как имеющую множественные aberrации. Ахроматические пробелы (гепы однонитевые участки в дуплексной – двунитевой - молекуле ДНК), определяемые визуально как нарушения целостности окраски хроматиды, не превышающие по размеру ее ширины и не сопровождающиеся сдвигом дистального участка относительно ее оси [2], оценивают отдельно и не включают в общее число aberrаций.

3.5. Оценка результатов

Оценку результатов цитогенетического анализа проводят путем сопоставления долей клеток с хромосомными aberrациями в контрольных и опытных сериях эксперимента. Частоту клеток с гепами используют в качестве

дополнительного критерия цитогенетической активности.

Статистический анализ полученных данных проводят на каждый срок забоя животных отдельно путем сравнения между опытными и контрольными сериями по критерию соответствия χ^2 [7].

Заключение о наличии (отсутствии) влияния активированных вод на показатели нестабильности генома клеток крови человека делают по:

- результатам сравнения с негативным контролем по всем указанным параметрам;
- наличию и характеру зависимости эффекта от условий активации воды;
- коэффициентам β регрессионных уравнений, которые характеризуют нарастание эффекта на единицу воздействия (изменения продолжительности активации воды и ее физико-химических показателей).

Таблица 3. Протокол цитогенетического анализа частоты аберраций хромосом в клетках костного мозга лабораторных грызунов

Серия опыта	Мышь №	Прос- мотре- но клеток n = 38 - 42	Клеток с абер- раци- ями	Аберрации			Кол-во клеток с множ. абер.	Кол-во клеток с про- белами	Доля абер- рант- ных клеток (%)	МИ / 1000 клеток
				Фрагменты		Об- мены				
				Оди- ноч ные	парные					
1	1	100								
	2	100								
	3	100								
	4	100								
	5	100								
	6	100								
2	7	100								
	8	100								
	9	100								
	10	100								
	11	100								
	12	100								

Примечание: пластинки, содержащие более 42 хромосом, не включают в число 100 клеток, анализируемых на каждое животное, и отмечают отдельно

3.6. Протокол результатов оценки цитогенетической активности в тесте на индукцию хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей

Вода (название, источник)

Прибор, условия получения.....

Физико-химические свойства

Животные.....

Условия экспозиции, продолжительность, сроки и вид забоя.....

Контроли.....

Полученные результаты: (вода индуцирует / не индуцирует генотоксическую активность; прибор может/не может быть использован для активации воды в быту).

Дата проведения работы.....

Список цитированной литературы

Исполнители:

Дата сдачи отчета:

4. АЛГОРИТМ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ АКТИВИРОВАННЫХ ВОД

На рис.1 представлена минимальная батарея для оценки потенциальной генотоксичности питьевых вод с измененными физико-химическими свойствами.

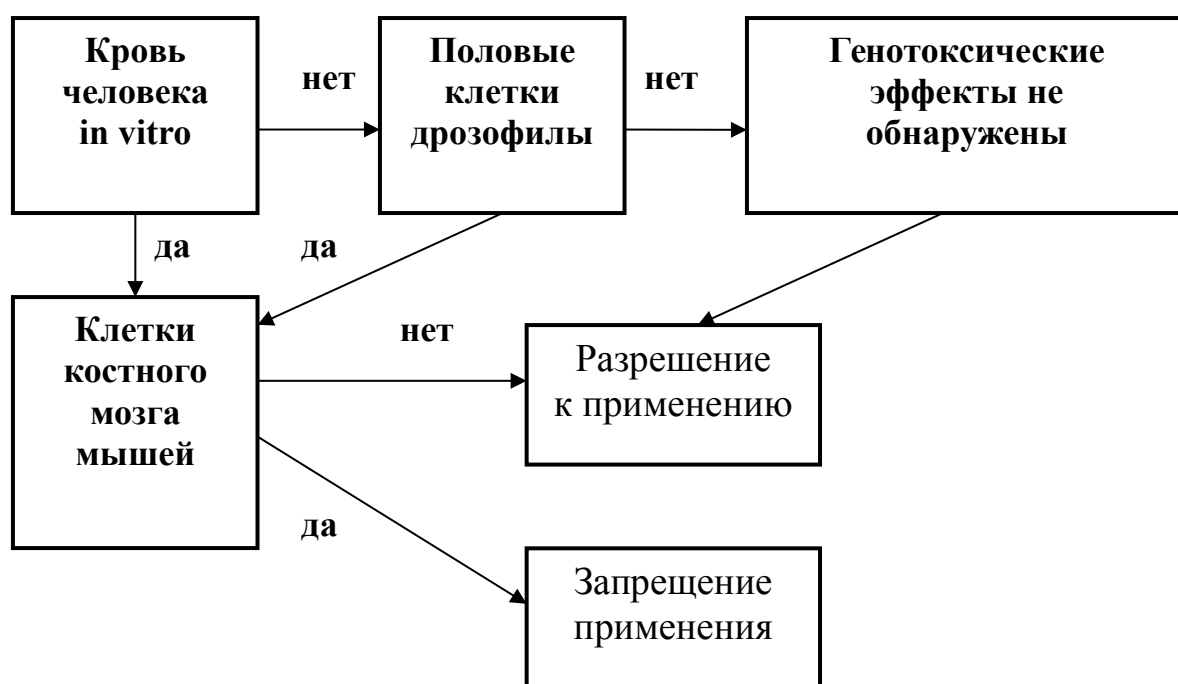


Рисунок 1. Алгоритм анализа генотоксических эффектов активированных вод

Этот же алгоритм следует использовать для гигиенической оценки безопасности оборудования, применяемого для приготовления вод с измененными физико-химическими свойствами.

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

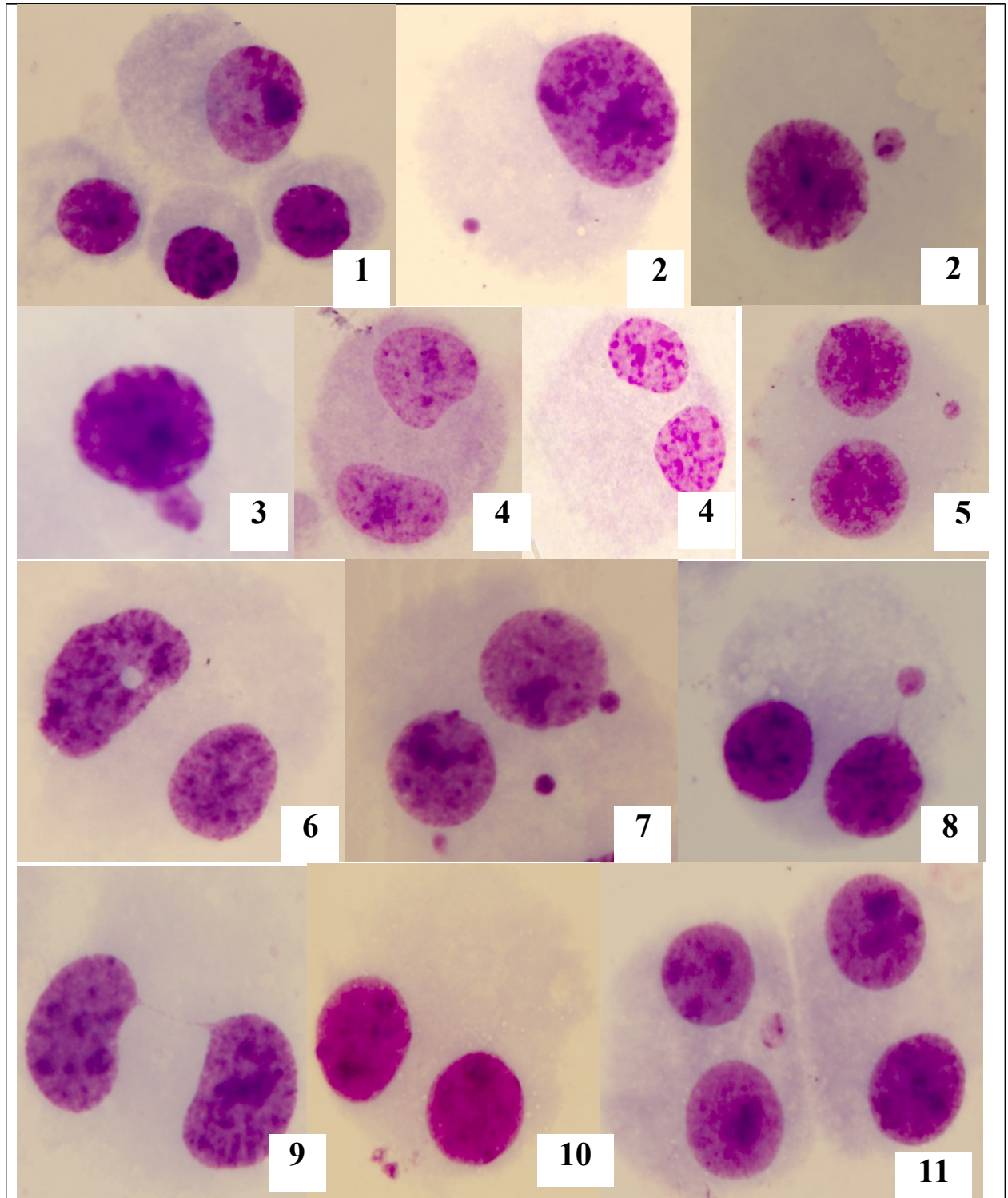
Литература

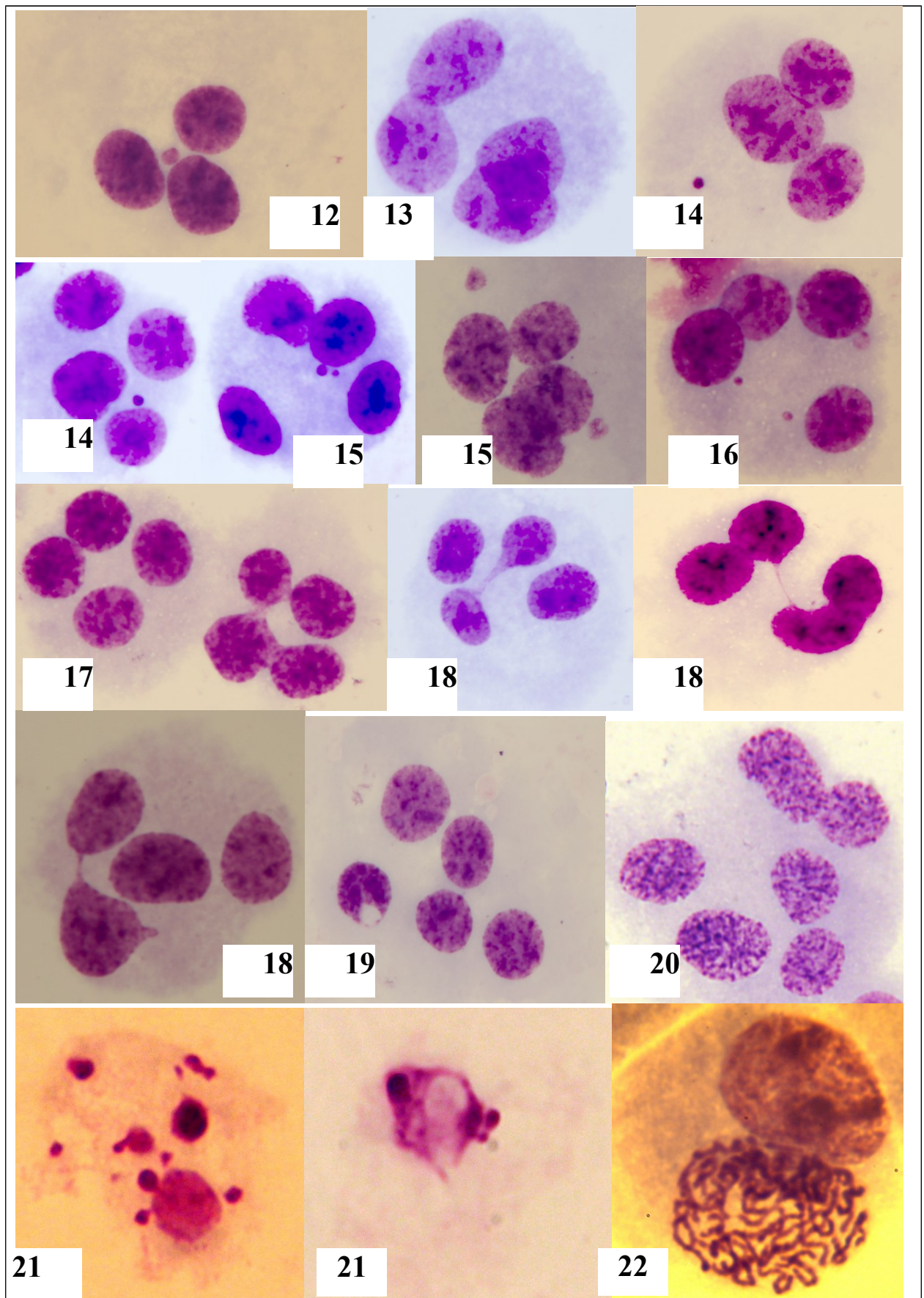
1. Аксенов С.И. Вода и ее роль в регуляции биологических процессов. – М.: Ин-т компьютер. исслед., 2004 . – 212 с.
2. Арефьев В.А., Лисовенко Л.А. Англо-русский толковый словарь генетических терминов / под ред. Л.И.Патрушев. - Москва: Изд-во ВНИРО, 1995. - 407с.
3. Бочков Н.П., Демин Ю.С., Лучник Н.В. Классификация и методы учета хромосомных aberrаций в соматических клетках // Генетика. - 1972. - Т. 8. - № 5. - С. 133-141.
4. Бочков Н.П. Анализ типов aberrантных клеток - необходимый элемент биологической индикации облучения // Мед. Радиология. - 1993. - №2. - С. 31-35.
5. Вода – космическое явление. Кооперативные свойства и биологическая активность / под ред. акад. РАМН Ю.А.Рахманина, В.К.Кондратова - М.: РАЕН, 2002. - 427с.
6. Гуськов А.С., Ингель Ф.И., Губернский Ю.Д., Беззубов А.А., Малышева А.Г., Растянников Е.Г., Аэроионификация и ее влияние на состояние здоровья работающих Гигиена и санитария, 2005, №4, с.32-34
7. Закс Л. Статистическое оценивание. - М.: Статистика, 1976. – 598 с.
8. Изюмов Ю.Г., Литвинова Е.М., Шварцман П.Я. Реализация повреждений, индуцированных этиленмином на разных стадиях сперматогенеза, при хранении спермы в семяприемниках интактных самок // Химический

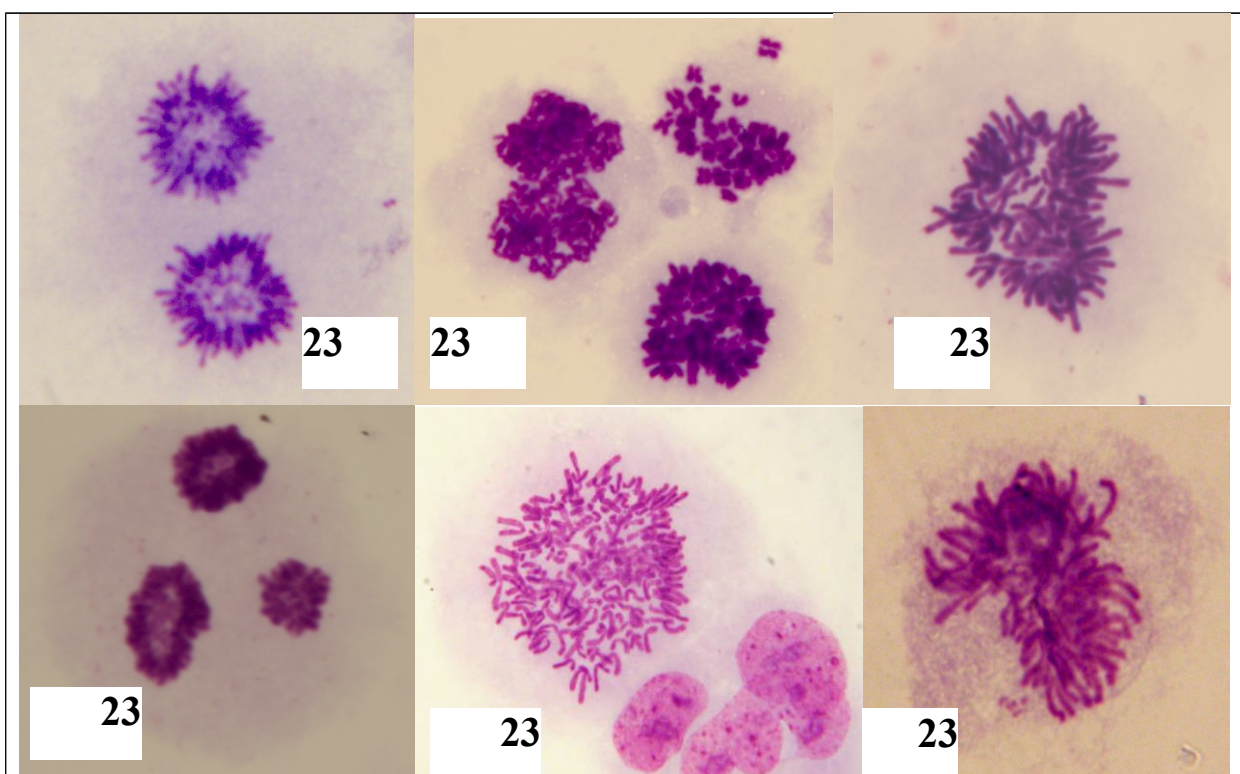
- мутагенез: Сб. науч. трудов.- Л.: Изд-во ЛГПИ им. А. И. Герцена, 1976.- С.64-70.
9. Ингель Ф.И. Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока. Часть 1. Пролиферация клеток // Экологическая генетика. – 2006. - Т.IV. - вып.3. - С.7-19; Часть 2. Влияние факторов среды и индивидуальных особенностей доноров в системе оценки нестабильности генома человека // Экологическая генетика. – 2006. - Т.IV. - вып.4. - С.39-54.
 10. Козак М.Ф. Дрозофила – модельный объект генетики: учебно-методическое пособие для студентов. – Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет», 2007. – 87 с.
 11. Малащенко А.М., Суркова Н.И., Семенов Х.Х. Определение мутагенности химических соединений (генетический скрининг) на лабораторных мышах (методические указания). – М.: - Медицина, 1977. - С.12.
 12. Медведев Н.И. Практическая генетика. – М.: Наука, 1968. – С. 294.
 13. Рахманин Ю.А., Стехин А.А., Яковлева Г.В. Структурно – энергетические изменения воды и ее биологическая активность // [Гигиена и санитария](#). - 2007. - № 5. - С. 34-36.
 14. Савостикова О.Н. Гигиеническая оценка влияния структурных изменений в воде на ее физико-химические и биологические свойства: дисс. ... канд. мед. наук. - М.: ГУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина РАМН, 2008. – 160с.
 15. Тимошевский В.А., Назаренко С.А. Биологическая индикация мутагенных воздействий и генетической нестабильности у человека путем учета числовых хромосомных нарушений // Вестник ВОГиС. – 2006. – Т.10. - № 3. - С.530-539.
 16. Худолей В.В. Канцерогены: характеристики, закономерности, механизмы действия. - СПб., 1999. – 373 с.
 17. Ingel F., Zatsepina O., Stekhin A., Yakovleva G., Savostikova O., Alekseeva A., Iksanova T.. Electrochemically activated water induced effects of genomic

- instability in various living objects in vitro and in vivo // Central European Journal of Occupational and Environmental Medicine. – 2009. - Vol.15, No 1-2, p.53-64
18. OECD 475. Mammalian bone marrow chromosome aberration test. Test Guideline 475. OECD, Paris, 2009.
 19. OECD 487. In Vitro mammalian cell micronucleus test. Test Guideline 487. OECD, Paris, 2010.
 20. Parry J.M. A proposal for a new OECD Guideline for the in vitro micronucleus test. URL: <http://www.oecd.org/dataoecd>.
 21. Ried Th., Schröck E., Ning Yi, Wienberg J. Chromosome painting: a useful art Human // Molecular Genetics. - 1998, - Vol. 7, No. 10. - Review 1619–1626.
 22. Smith L.E., Na-gar S., Kim G.J., Morgan W.F. Radiation-induced genomic instability: radiation quality and dose response // Health Phys. - 2003. - V.85. - № 1. - P.23-29.
 23. Surowy H., Rinckleb A., Luedeke M., Stuber M., Wecker A, Varga D, Maier Ch., Hoegel J., Vogel W. Heritability of baseline and induced micronucleus frequencies. REVIEW // Mutagenesis. – 2011.- vol.26. - no.1 P.111–117, doi:10.1093/mutage/geq059.
 24. Titenko-Holland N., Jacob R.A., Shang N. et al. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in filate // Mutat Res.-1998.-V.417. - P.101-114.
 25. Vogel E.W., Nivard M.J. The response of germ cells to ethylene oxide, propylene oxide, propylene imine and methyl methanesulfonate is a matter of cell stage-related DNA repair // Environ Mol Mutagen. – 1997. – V.29(2)/ - P.124-135
 26. (18) Weiss R.S., Enoch T., Leder Ph. Inactivation of mouse Hus1 results in genomic instability and impaired responses to genotoxic stress // Genes Dev. – 2000. – V.14. – P.1886-1898, doi:10.1101/gad.14.15.1886
 27. Würigler F.E., Graf U. Mutagenicity testing with *Drosophila melanogaster* // Basic Life Sci. – 1985. – V.34. – P.343-372.

Микрофотографии основных цитогенетических эффектов нестабильности генома, определяемых при культивировании клеток крови в условиях цитокинетического блока. Окраска азур-эозином по Романовскому, увеличение 10 x 100, масляная иммерсия







1 – одноядерные клетки; 2 – одноядерные клетки с микроядром; 3 – одноядерная клетка с протрузией; 4- двуядерные клетки; 5 – двуядерные клетки с микроядром; 6 - двуядерная клетка с внутренним мостом; 7 – двуядерная клетка с 3 микроядрами; 8 – двуядерная клетка с микроядром типа «разбитое яйцо»; 9 – двуядерная клетка с нуклеоплазменным мостом; 10 - двуядерная клетка с 2 микроядрами; 11 – две двуядерные клетки, одна с микроядром; 12 - трехъядерная клетка с микроядром; 13 – четырехъядерная клетка; 4- полиядерная клетка; 5-13 – четырехъядерная клетка; 14 - четырехъядерная клетка с микроядром; 15 - четырехъядерная клетка с 2 микроядрами; 16 - четырехъядерная клетка с 3 микроядрами; 17 – две четырехъядерные клетки, правая с двумя нуклеоплазменными мостами; 18 - четырехъядерная клетка с нуклеоплазменными мостами; 19 – пятиядерная клетка; 20 – шестиядерная клетка; 21 – апоптоз; 22 – асимметричный митоз; 23 - митоз