УДК 577.334

ЯМР И ЭПР ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВОДЫ С ПОНИЖЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ДЕЙТЕРИЯ НА ПОКАЗАТЕЛИ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ[1]

Барышев М. Г.[2]***, Басов А. А.***[3]***, Болотин С. Н.***[4]***, Джимак С. С.***[5]***, Кашаев Д. В.***[6]***, Федосов С. Р.***[7]***, Фролов В. Ю.***[8]***, Малышко В. В.***[9]***, Власов Р. В.***[10]

NMR AND EPR STUDY OF DEUTERIUM PEPLETED WATER EFFECT ON THE LABOROTARY ANIMALS' PROOKSIDANT-ANTIOKSIDANT SYSTEM

Barishev M. G., Basov A. A., Bolotin S. N., Dzhimak S. S., Kashaev D. V., Fedosov S. R., Frolov V. U., Malishko V. V., Vlasov R. V.

Nuclear magnetic resonance spectroscopy revealed a decrease of the deuterium quantity in blood plasma, erythrocytes and homogenate in the laboratory mice' hearts infected with Staphylococcus aureus, using deuterium depleted water for month period. No changes of isotope structure was revealed in the mice infected with Staphylococcus aureus and supplied with usual water. It is defined through EPR spectroscopy method that the quantity of the paramagnetic centers in heart and liver tissues of the mice receiving deuterium depleted water after lyophilization has decreased 4 times in comparison with the control group that showed reduction of free radicals quantity and favorable influence of deuterium depleted water on animals' bodies.

Keywords: deuterium depleted water, NMR spectroscopy, EPR spectroscopy, free radicals, oxidative stress.

В современной профилактической медицине большое внимание уделяется коррекции метаболических нарушений в организме на доклиническом этапе с целью предупреждения развития стойких осложнений. Одной из неспецифических защитных систем организма является антиоксидантная система (АОС) [1]. Известно, что антиоксиданты регулируют нормальную деятельность организма человека, в частности процессы окисления липидов, белков и нуклеиновых кислот, в результате которых в клетках образуются высокоактивные соединения кислорода и свободные радикалы [2, 3]. В физиологи-

[1]Работа выполнена при поддержке РФФИ (11-04-96523-р_юг_ц).

[2]Барышев Михаил Геннадьевич, д-р биол. наук, профессор кафедры радиофизики и нанотехнологий Кубанского государственного университета; e-mail: science-pro@kubsu.ru.

[3]Басов Александр Александрович, канд. мед. наук, доцент кафедры фундаментальной и клинической биохимии Кубанского государственного медицинского университета; e-mail: son_sunytch79@mail.ru.

[4]Болотин Сергей Николаевич, канд. хим. наук, доцент кафедры геоэкологии и природопользования Кубанского государственного университета; e-mail: bolotka@list.ru.

[5]Джимак Степан Сергеевич, канд. биол. наук, доцент кафедры радиофизики и нанотехнологий Кубанского государственного университета; e-mail: jimack@mail.ru.

[6]Кашаев Денис Владимирович, инженер Научно-образовательного центра, Центра коллективного пользования «Диагностика структуры и свойств наноматериалов» Кубанского государственного университета; e-mail: den_kashaev@mail.ru.

[7]Федосов Сергей Ростиславович, канд. мед. наук, ассистент кафедры общей хирургии Кубанского государственного медицинского университета; e-mail: sergey_fedosov@mail.ru.

[8]Фролов Владимир Юрьевич, канд. хим. наук, доцент кафедры общей, неорганической химии и ИВТ в химии Кубанского государственного университета; e-mail: frolov@chem.kubsu.ru.

[9]Малышко Вадим Владимирович, клинический интерн кафедры общей хирургии Кубанского государственного медицинского университета; e-mail: intro-2@rambler.ru.

[10]Власов Роман Викторович, студент Кубанского государственного медицинского университета; e-mail: 4d10_5s1@mail.ru.

ческих условиях свободные радикалы необходимы для нормального дыхания, обмена веществ и уничтожения чужеродных бактерий. В то же время при избыточном усилении неконтролируемых реакций свободнорадикального окисления может развиваться типовой патологический процесс, характеризующийся усиленным образованием первичных радикалов (супероксидный анион-радикал, оксид азота), реактивных молекул (синглетный кислород, пероксид водорода, гидропероксиды), вторичных радикалов (гидроксильный радикал, алкилы, алкоксилы, пероксилы) на фоне угнетения ферментных (супероксидиссмутаза, каталаза, глутатионредуктаза) и неферментных (витамины, тиолсодержащие соединения, полифенолы) звеньев антиоксидантной системы (АОС), что сопровождается дисбалансом функционирования защитных систем организма и снижением его неспецифической резистентности к патологическим процессам [4].

Питание — один из факторов, существенно влияющий на здоровье, работоспособность и продолжительность жизни человека. В настоящее время, помимо оптимального соотношения компонентов пищи и минеральных веществ в рационе, большое внимание уделяется влиянию нутриентов на показатели эндогенной антиоксидантной системы и уровень свободнорадикального окисления в организме, что может способствовать увеличению продолжительности активной жизнедеятельности и профилактике осложнений ряда заболеваний, в патогенезе которых существенную роль играют явления окислительного стресса (сахарный диабет, атеросклероз, бронхиальная астма, опухолевые и воспалительные заболевания различной локализации и др.).

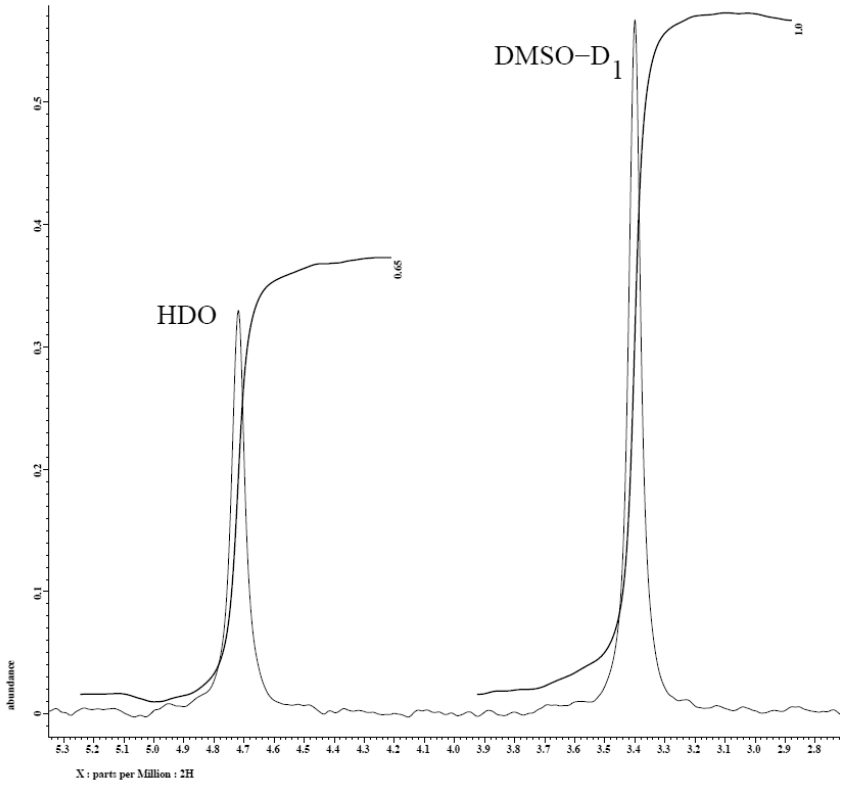
Наибольший интерес представляет возможность выявления антиоксидантных средств, специфически действующих на конкретные звенья процессов свободнорадикального окисления, а так же препятствующих избыточному образованию продуктов перекисного окисления и устраняющих токсические эффекты последних [5]. Важным при этом представляется отбор для дальнейших испытаний таких веществ, которые при внедрении в клиническую практику, наряду с высокой эффективностью антиоксидантного действия, проявляли бы минимум побочных эффектов. Одним из возможных факторов, повышающих работу АОС, может служить вода с пониженным содержанием дейтерия. Известно, что человек в физиологических условиях потребляет 2–3 л жидкости в сутки, поэтому изменения структуры питания за счет воды со сниженным содержанием дейтерия может оказывать влияние на показатели АОС. Биологические эффекты воды с пониженным содержанием дейтерия описаны в работе [6].

Целью исследования являлось изучение влияние воды с пониженным содержанием дейтерия (относительно природного уровня) на показатели прооксидантно-антиоксидантной системы и количественное содержание дейтерия в тканях лабораторных крыс в одномесячном эксперименте.

С целью активации прооксидантно-антиоксидантной системы были отобраны 12 лабораторных крыс, после чего их всех заразили *Staphylococcus aureus*. Далее крысы были разделены на 2 группы в зависимости от питьевого рациона. Животные I группы ($n = 6$) получали стандартный рацион (зерновая смесь, хлеб, молоко) и воду со стандартным содержанием дейтерия (330 мг/л) в течение 30 дней. Животные II группы ($n = 6$) также получали стандартный рацион и воду с пониженным содержанием дейтерия (132 мг/л) в течение 30 дней. Объектом исследования была кровь лабораторных животных (крысы). Оценку показателей АОС в плазме крови проводили с помощью амперометрического метода на амперометрическом детекторе Яуза–ААА-01, выражая в нА·с [7]. Интенсивность процессов свободно-радикального окисления (СРО) в плазме крови определяли хемилюминесцентным методом на люминотестере ЛТ-01 в условных единицах (усл. ед.) по максимуму и площади H_2O_2-индуцированной вспышки хемилюминесценции (ВХЛ) на основе методики НИИБИ г. Ростова-на-Дону, в модификации с использованием специализированного программного обеспечения.

Получение гомогенатов тканей осуществляли путем механического измельчения органов (сердце, печень, почки) до получения однородной массы с последующим центрифугированием при 3 000 об/мин. в течение 20 мин. Полученный супернатант забирали с помощью микропипетки в объеме 2 мл.

Для определения количественного содержания свободных радикалов методом ЭПР спектроскопии в сердце, печени и почках их



Сотношения интегральных интенсивностей ^{2}D ЯМР сигнала HDO, относительно ^{2}D ЯМР сигнала DMSO-D_1

подвергали лиофильной сушке (аппарат: сушилка лиофильная ЛС-1000).

Определение концентрации дейтерия в биологических жидкостях и гомогенатах тканей были проведены на импульсном ЯМР спектрометре JEOL JNM-ECA 400MHz. Съёмка спектров проводилась на соответствующей резонансной частоте ядер дейтерия — 61,4 МГц. Параметры съёмки: 6,7 с (acquisition time), 20 с (relaxation delay), 5,6 мкс (x-pulse), 0,15 Гц (resolution). Температура съёмки — 25°C, при этом точность стабилизации 0,2°C. Измерения проводились с использованием 5 мм ампулы, внутри которой был строго зафиксирован запаенный капилляр, содержащий откалиброванную в определяемой концентрационной шкале смесь дейтерированного и недейтерированного диметилсульфоксида (DMSO), дающего ^{2}D ЯМР сигнал в области 3,4 м.д. (относительно $(CD_3)_4Si$), в то время как ^{2}D ЯМР сигнал HDO находится в области 4,7 м.д. (относительно $(CD_3)_4Si$). Пики получаемых сигналов отображены на рисунке.

Обработка полученных спектров заключалась в определении соотношения интегральных интенсивностей ^{2}D ЯМР сигнала HDO, содержащейся в исследуемом образце относительно ^{2}D ЯМР сигнала DMSO-D_1, интенсивность которого была определена при таких же условиях относительно стандартов — образцов воды с точно определённым содержанием дейтерия (8,2 мг/л, 110,5 мг/л, 332 мг/л). Измерения каждого образца проводились неоднократно для уменьшения погрешностей эксперимента. При этом точность определения содержания дейтерия в биологических образцах составила ±2 мг/л.

Измерение спектров ЭПР проводили при комнатной температуре на спектрометре JES FA300 (JEOL, Япония) в X-диапазоне. Условия измерения: СВЧ мощность 1 мВт, частота микроволнового излучения 9 144 МГц, амплитуда высокочастотной модуляции 0,1 мТл. Образцы измеряли в кварцевой ампуле (5 мм), масса навески в зоне резонатора составляла 0,0300 г. Концентрацию парамагнитных центров (ПМЦ) в образцах определяли путем сравнения с сигналом стандартного образца (TEMPOL). Интегральную интенсивность сигнала ЭПР в ис-

Содержание дейтерия в плазме крови, эритроцитах и гомогенатах тканей крыс

Образец		Содержание дейтерия, мг/л
Плазма крови	Контроль	332,0
	Опыт	283,3
Эритроциты	Контроль	234,4
	Опыт	178,0
Гомогенат сердца	Контроль	303,9
	Опыт	282,1
Гомогенат почек	Контроль	297,3
	Опыт	297,3
Гомогенат печени	Контроль	284,3
	Опыт	282,1

следуемых образцах определяли путем двойного численного интегрирования по методу прямоугольников [8].

Через тридцать дней, после начала проведения эксперимента в опытной и контрольной группах наблюдали внешние отличия. Животные в опытной группе внешне выглядели здоровыми, без каких-либо отклонений. В контрольной группе наблюдали органические нарушения на ушах, носу. Биопсийное исследование показало, что у некоторых мышей в контрольной группе произошло образование Невуса Беккера — пигментный волосяной эпидермиальный невус с воспалением. ШИФРЫ МКБ: Шифр D23.3 Другие доброкачественные новообразования кожи.

Проведенными исследованиями установлено, что показатели антиоксидантной активности (АОА) плазмы крови у животных в I составили 1287,3±11,6. В то же время у животных II группы показатели АОА были выше на 9,2 % в сравнении группой I ($p < 0{,}05$), что свидетельствует о повышении у них активности АОС и позволяет говорить об улучшении работы системы неспецифической защиты организма. У крыс II группы показатели СРО были снижены на 24,8 % в сравнении с группой I, что указывает на замедление процессов образования свободных радикалов при использовании воды со сниженным содержанием дейтерия. Такие изменения прооксидантно-антиоксидантной системы с преобладанием антиоксидантного потенциала на системном уровне следует рассматривать как фактор повышения неспецифической защиты организма. При исследовании гомогенатов сердца печени и почек у крыс статистически достоверных отличий по уровню антиокислительной активности и интенсивности свободнорадикального окисления зарегистрировано не было ($p > 0{,}05$).

Результаты исследования содержания дейтерия в плазме крови, эритроцитах и гомогенатах тканей приведены в таблице.

Как видно из таблицы, после употребления крысами воды с пониженным содержанием дейтерия в течение месяца, его концентрация в плазме крови снизилась на 48,7 мг/л, в эритроцитах на 56,4 мг/л, в гомогенате сердца на 21,8 мг/л. В гомогенатах почек и печени не удалось зафиксировать значительного отличия содержания дейтерия в опытной и контрольной группах крыс. Возможно, при проведении более длительного эксперимента удастся обнаружить отличия в содержании дейтерия и в этих тканях.

Спектры ЭПР образцов сердца лабораторных животных содержат анизотропный синглетный сигнал, параметры спингамильтониана ($g_\perp = 2{,}0074$, $g\| = 2{,}003$) которого соответствуют стабильным радикалам [9, 10]. Спектры ЭПР образцов печени имеют аналогичных характер.

Результаты измерения концентрации парамагнитных центров (ПМЦ) в лиофилизированных тканях печени и сердца лабораторных животных показывают, что количество ПМЦ в исследуемых тканях уменьшается примерно в 4 раза по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о благоприятном воздействии воды с пониженным содержанием дейтерия на организм животных. В лиофилизированных тканях почек отличий между опытной и контрольной группами не обнаружено.

Таким образом, установлено, что употребление воды с пониженным содержанием дейтерия относительно природного уровня HDO, приводит к снижению концентра-

ции этого элемента в плазме крови, эритроцитах и гомогенате сердца лабораторных животных. Такие изменения в свою очередь, ведут к уменьшению прооксидантной нагрузки в организме и восстановлению баланса прооксидантно-антиоксидантной системы, что в дальнейшем сопровождается повышением иммунитета у лабораторных животных.

Литература

1. *Дубинина Е. Е.* Некоторые особенности функционирования ферментативной антиоксидантной защиты плазмы крови человека // Биохимия. 1993. Т. 58. № 2. С. 268–273.
2. *Владимиров Ю. А.* Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестник РАМН. 1998. № 7. С. 43–51.
3. *Gutteridge J. M. C., Wilkins S.* Copper salt-dependent hydroxyl radical formation. Damage to proteins acting as antioxidants // Biochim. Biophys. Acta. 1983. Vol. 758. P. 38–41.
4. *Christen Y.* Oxidative stress and Alzheimer's disease // Am. J. Clin. Nutr. 2000. Vol. 71. P. 621–629.
5. *Young I. S., Woodside J. V.* Antioxidants in health and disease // J. Clin. Pathol. 2001. Vol. 54. P. 176–186.
6. *Барышев М. Г., Болотин С. Н., Васильев Н. С., Джимак С. С., Долгов М. А., Фролов В. Ю.* Электрохимический способ получения и биологические свойства воды с пониженным содержанием дейтерия // Наука Кубани. № 3. 2010. С. 18–21.
7. *Басов А. А., Павлюченко И. И., Плаксин А. М., Федосов С. Р.* Использование аналогово-цифрового преобразователя в составе системы сбора и обработки информации с хемилюминитестером LT-1 // Вестник новых мед. технологий. 2003. Т. 10. № 4. С. 67–68.
8. *Бахвалов Н. С., Жидков Н. П., Кобельков Г. М.* Численные методы. М.: Физматлит, 2001. 630 с.
9. *Боровик Е. С, Еременко В. В., Мильнер А. С.* Лекции по магнетизму. М.: Физматлит, 2005. 512 с.
10. *Ажипа Я. И.* Медико-биологические аспекты применения метода электронного парамагнитного резонанса. М.: Наука, 1983. 528 с.

Ключевые слова: вода с пониженным содержанием дейтерия, ЯМР спектроскопия, ЭПР спектроскопия, свободные радикалы, окислительный стресс.

Статья поступила 12 июля 2011 г.
Кубанский государственный университет, г. Краснодар
Кубанский государственный медицинский университет, г. Краснодар
© Барышев М. Г., Басов А. А., Болотин С. Н., Джимак С. С., Кашаев Д. В., Федосов С. Р., Фролов В. Ю., Малышко В. В., Власов Р. В., 2011